



# **UNIVERSIDAD DE INVESTIGACIÓN DE TECNOLOGÍA EXPERIMENTAL YACHAY**

**Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería**

**EXPRESIÓN GENÉTICA DIFERENCIAL DEL PROMOTOR YLR346C DE  
*Saccharomyces cerevisiae* EN PRESENCIA DE PESTICIDAS UTILIZADOS EN  
ECUADOR.**

**Trabajo de titulación para obtener el título de Magister en Biología Sintética**

**Autor:**

Diana Estefania Arias Arias

**Tutor:**

Ph.D, Fernando Alexis Gonzales Zubiarte

Urcuqui, Diciembre 2024

## **AUTORÍA**

Yo, **Diana Estefania Arias Arias**, con cédula de identidad 0104425368, declaro que las ideas, juicios, valoraciones, interpretaciones, consultas bibliográficas, definiciones y conceptualizaciones expuestas en el presente trabajo; así cómo, los procedimientos y herramientas utilizadas en la investigación, son de absoluta responsabilidad del autor del trabajo de titulación.

Así mismo, me acojo a la normativa interna de la Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay.

San Miguel de Urququí, diciembre, 2024

---

**Diana Estefania Arias Arias**

**0104425368**

## **AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo, **Diana Estefania Arias Arias**, con cédula de identidad 0104425368, cedo a la Universidad de Tecnología Experimental Yachay, los derechos de publicación de la presente obra, sin que deba haber un reconocimiento económico por este concepto. Declaro además que el texto del presente trabajo de titulación no podrá ser cedido a ninguna empresa editorial para su publicación u otros fines, sin contar previamente con la autorización escrita de la Universidad.

Asimismo, autorizo a la Universidad que realice la digitalización y publicación de este trabajo de titulación en el repositorio virtual, de conformidad a lo que dispone la Ley Orgánica de Educación Superior

San Miguel de Urququí, diciembre 2024

---

**Diana Estefania Arias Arias**

**0104425368**

## **DEDICATORIA**

Esta tesis está dedicada a mis padres Alejandro y Anita quienes me han brindado las herramientas necesarias para mi crecimiento personal y profesional, siendo mi guía y ejemplo, mostrándome el camino de los grandes logros y sueños.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi gratitud a mi tutor, Fernando Gonzales, PhD, por su invaluable guía, conocimientos y apoyo durante cada etapa de este proyecto, lo que fue fundamental para alcanzar los objetivos planteados.

Extiendo también mi agradecimiento al profesor Javier Álvarez, PhD, y al profesor Lenin Ramírez, PhD, cuyo acompañamiento, consejos y apoyo fueron clave en la realización de este trabajo.

Agradezco a la Universidad Yachay Tech por proporcionarme el espacio y los recursos necesarios para llevar a cabo mi tesis de maestría. Asimismo, reconozco el respaldo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) por la beca que me permitió acceder a una formación de calidad.

De manera especial, quiero agradecer a Yuliana Mora y Fausto Zurita, por su constante apoyo durante este proceso, y a los técnicos de laboratorio Belén, Dennis, Isaac y Génesis, por su invaluable disposición y colaboración en el laboratorio. También expreso mi gratitud a todos los profesores que formaron parte de mi proceso académico.

Finalmente, agradezco con todo mi corazón a mi familia y amigos, quienes, con su apoyo incondicional, palabras de aliento y ánimo constante, me ayudaron a superar cada desafío.

## RESUMEN

El aumento del uso de pesticidas en la agricultura dentro de los últimos años, da una alerta por sus efectos en la salud de la población y la contaminación del medio ambiente, por lo que se busca crear métodos más efectivos para su detección. Este trabajo investiga el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como posible biosensor para identificar la presencia de estos compuestos. Se eligió el gen YLR346C, conocido por su reacción al estrés, y se analizó su expresión de fluorescencia en presencia del pesticida pirimetanil, para esto fueron usados varios métodos de biología molecular. Se diseñaron vectores de expresión *in silico* y posteriormente se lo realizó *in vivo* para observar la actividad del gen YLR346C en respuesta al pesticida. Los ensayos realizados mostraron una relación entre la concentración de pirimetanil y la expresión del gen, y también se encontró que el tiempo de exposición influye en la respuesta de expresión. Los resultados iniciales muestran que este gen podría utilizarse como un posible biosensor que detecte pesticidas. Es necesario realizar más estudios para optimizar y corroborar las condiciones de detección y examinar la sensibilidad del biosensor frente a otros pesticidas.

**Palabras clave:** Biosensores, Clonación de ADN, Fluorescencia, Pesticidas, *Saccharomyces cerevisiae*.

## **ABSTRACT**

The increase use of pesticides in agriculture in recent years raises concerns due to their effects on public health and environmental contamination, prompting the search for more effective detection methods. This study investigates the use of *Saccharomyces cerevisiae* yeast as a potential biosensor to identify the presence of these compounds. The YLR346C gene, known for its stress response, was select, and its fluorescence expression was analyzed in the presence of the pesticide pyrimethanil, using various molecular biology techniques. Expression vectors were designed *in silico* and later implemented *in vivo* to observe YLR346C gene activity in response to the pesticide. The tests conducted showed a correlation between pyrimethanil concentration and gene expression, and it was also found that exposure time influences expression response. Initial results suggest that this gene could be used as a potential biosensor for pesticide detection. Further studies are needed to optimize and verify detection conditions and assess the biosensor's sensitivity to other pesticides.

Key words: Biosensors, DNA cloning, Fluorescence, Pesticides, *Saccharomyces cerevisiae*.

## ÍNDICE

Introducción-----	1
Justificación-----	5
Hipótesis-----	6
Objetivos-----	6
Objetivo general:-----	6
Objetivos específicos:-----	6
Materiales y métodos-----	7
Plásmidos y Cepas-----	7
Medios de Cultivo-----	8
Softwares de análisis de secuencia-----	10
Clonación-----	11
Electroporación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -----	11
Extracción y Purificación de ADN plasmídico-----	11
Electroforesis en gel de Agarosa del plásmido YLR346C-----	12
Electroporación de Levaduras-----	12
Exposición a pesticidas a diferentes concentraciones y curvas de crecimiento-----	13
Fijación de placas para observación en el microscopio-----	13
Análisis Estadístico en RStudio-----	14
Resultados-----	15
Análisis Bioinformático del vector plasmídico pUG35 y vector recombinante 35-YLR346C-----	15
Clonación del Promotor YLR346C en el vector pUG35-----	17
Amplificación del fragmento clonado de YLR346C-----	17
Screening de clones correctos de ligación-----	19
Secuenciación del promotor 35-YLR346C-----	20

Curvas de Crecimiento de levaduras expuestas a pesticida -----	20
Análisis de intensidad de GFP -----	22
Microscopia de Fluorescencia de 35-YLR346C-----	27
Análisis Estadístico -----	30
Discusión -----	32
Conclusión -----	34
Bibliografía -----	35
Anexos -----	39

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Marca y modelo de los equipos utilizados a lo largo de este estudio -----	7
<b>Tabla 2:</b> Plásmidos y cepas usados en el estudio -----	8
<b>Tabla 3:</b> Componentes y concentraciones para realizar medio LB-----	9
<b>Tabla 4:</b> Componentes y composición de medio rico YPD para cultivo de levadura ----	9
<b>Tabla 5:</b> Medio mínimo de YNB Dextrosa -----	9
<b>Tabla 6:</b> Concentraciones de aminoácidos -----	10
<b>Tabla 7:</b> Componentes y concentraciones de corte con enzimas -----	12
<b>Tabla 8:</b> Condiciones de PCR estandarizadas para amplificar el fragmento clonado de YLR346C-----	17
<b>Tabla 9:</b> Resultados de ANOVA realizados en RStudio-----	31
<b>Tabla 10:</b> Resultados de los análisis en RStudio, Test de Dunnett comparando Tiempo y Concentración. -----	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1 (B):</b> Mapa del vector con la inserción del promotor 35-pYLR346C con un tamaño de 5915 pb. Mapa realizado en el programa bioinformático Benchling. Se observa seleccionado en color morado la inserción del promotor YLR346C -----	16
<b>Figura 2:</b> Amplificación por PCR del promotor YLR346C. Columna 1: Marcador de peso 1kb (Thermo Fisher <sup>TM</sup> ). Columna 2: Banda de amplificación promotora YLR346C. Gel de agarosa al 1 %, intercalante bromuro de etidio-----	18
<b>Figura 3:</b> Gel de confirmación previo a purificación de fragmentos de ADN. Gel de agarosa al 1 % intercalante bromuro de etidio. Carril 1: Marcador 1 kb, carril 2: PCR digerido con enzimas SacI y Sall, carril 3: pUG35 digerido con enzimas SacI y Sall liberando el promotor que se quiere eliminar -----	18
<b>Figura 4:</b> Registro fotográfico de electroforesis del ADN plasmídico y cortes con enzimas. Se muestra en el carril 1 el marcador de peso de 1 kb de Thermo Fisher Scientific <sup>TM</sup> , carril 2 y 3: ADN plasmídico del vector 35-YLR346C, carril 4 y 5: corte enzimático de 35-YLR346C con las enzimas Sac1 y EcoR1, carril 7: ADN plasmídico del vector pUG34-control, carril 8: corte enzimático del vector pUG34-control con las enzimas EcoRV y Sac1. Gel de agarosa al 1 %, intercalante bromuro de etidio -----	19
<b>Figura 5:</b> El secuenciamiento del constructo 35-YLR346C confirmo la ligación correcta. Puede observarse en rojo y azul los sitios de restricción correspondientes a las enzimas SacI y Sall, respectivamente. En rosado se señala el fragmento del promotor YLR346C clonado. El cuadrado gris indica el codón de inicio (ATG) de la GFP, cuya secuencia codificadora completa esta resaltada en verde y el codón de terminación (TAA) esta resaltado dentro de un recuadro. La región subrayada representa la secuencia terminadora. -----	20
<b>Figura 6:</b> Curva de crecimiento del cultivo de levaduras expuestas al pesticida pirimetanil a diferente concentración y tiempo, día 1-----	21
<b>Figura 7:</b> Curva de crecimiento de levaduras expuestas a pesticida pirimetanil con diferente concentración y tiempo, día 2. -----	21
<b>Figura 8:</b> Curvas de crecimiento de levaduras expuestas a pesticida pirimetanil con diferente concentración y tiempo, día 3. -----	22
<b>Figura 9:</b> Gráficos de Intensidad de GFP en función del tiempo y concentración de pesticida, día 1. Gráfico A, intensidad de GFP a 0 horas; gráfico B, intensidad de GFP a 2 horas; gráfico C, intensidad de GFP a 4 horas -----	24

<b>Figura 10:</b> Gráficos de Intensidad de GFP en función del tiempo y concentración de pesticida, día 2. Gráfico A, intensidad de GFP a 6 horas; gráfico B, intensidad de GFP a 8 horas; gráfico C, intensidad de GFP a 10 horas -----	25
<b>Figura 11:</b> Gráficos de Intensidad de GFP en función del Tiempo y Concentración de pesticida, día 3. Gráfico A, intensidad de GFP a 4 horas, gráfico B, intensidad de GFP a 6 horas. -----	26
<b>Figura 12:</b> Microscopía: (A) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de exposición al pesticida tomadas a las 0 horas. (B) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de pesticida capturas a las 2 horas -----	28
<b>Figura 13:</b> Microscopía: (A) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de exposición al pesticida tomadas a las 4 horas. (B) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de pesticida capturas a las 6 horas -----	29
<b>Figura 14:</b> Microscopía: (A) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de exposición al pesticida tomadas a las 8 horas. (B) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de pesticida capturas a las 10 horas-----	30

## **Introducción**

Los pesticidas son ampliamente utilizados en la agricultura moderna haciendo frente a los requerimientos de la creciente población. No son solamente empleados en la agricultura sino para controlar plagas en entornos domésticos, jardinería, etc. Sin embargo, su alta toxicidad presenta riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Los trabajadores agrícolas y moradores cercanos a estas zonas están expuestos a estos productos, los cuales pueden provocar enfermedades graves como, diabetes, trastornos reproductivos, disfunción neurológica, cáncer y enfermedades respiratorias (Rani et al., 2021). De acuerdo con la organización de las naciones unidas para la alimentación y la salud (FAO), un plaguicida o pesticida es cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o controlar plagas, incluyendo especies no deseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y procesamiento de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales (FAO-WHO, 2024).

Existen diversos tipos de pesticidas, como los organoclorados (OC), organofosforados (OP), carbamatos (CB), piretroides, clorfenoxis, triazinas y ftalimidas. Estos compuestos y sus residuos tienen una alta probabilidad de exposición al medio ambiente y tienden a persistir en él (Lee & Choi, 2020). Según la Organización mundial de la salud (OMS) la toxicidad de los pesticidas varía según su función y otros factores; por ejemplo, los herbicidas suelen ser menos tóxicos que los insecticidas. La intoxicación puede ocurrir por ingestión, inhalación o contacto directo con la piel. Los pesticidas son una de las principales causas de envenenamiento, ya que son tóxicos y se dispersan en el medio ambiente. Por ello, su producción, distribución y uso deben ser rigurosamente regulados y controlados (WHO, 2024). La dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica y el Ministerio de Salud Pública del Ecuador han reportado que, hasta la fecha, en el año de 2024 se han registrado 235 casos de intoxicación por plaguicidas. De estos casos, el 52,34 % se deben a herbicidas y funguicidas, mientras que el 28,94 % están vinculados a organofosforados y carbamatos. Los hombres son los más afectados, constituyendo el 71 % de los casos, con mayor prevalencia en el grupo etario de 20 a 49 años. La provincia de Manabí lidera en número de casos con 62, seguida por Guayas y Orellana, con 31 y 30 casos, respectivamente (Ministerio de Salud Pública, 2024).

El pirimetanil es un fungicida fenilaminopirimidina ampliamente usado en monocultivos, considerado de bajo riesgo para la salud humana por su baja solubilidad en agua y

resistencia a la degradación fotolítica e hidrolítica en entornos acuáticos. Este actúa bloqueando la producción de metionina y la liberación de enzimas necesarias para que los hongos infecten las plantas (PortalTecnológico, 2024). Se encuentran en concentraciones de 0,06 µg/L a 90 µg/L en aguas superficiales cercanas a campos agrícolas. En el suelo, su interacción con el carbono orgánico afecta su movilidad y persistencia, con vidas medias de degradación de hasta 80 días en sistemas sedimento-agua y variando entre 57 y 72 días en ambientes cálidos y fríos, respectivamente (Chen et al., 2024). Este fungicida es uno de los más utilizados, en especial contra el moho gris en cultivos como manzanas, fresas y pepinos. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) ha encontrado residuos en varias frutas y verduras, regulados por límites máximos de residuos (LMR). La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) establece una ingesta diaria aceptable de 0,17 mg/kg de peso corporal. La sobreexposición puede ser letal, por lo que es crucial mejorar métodos de detección sensibles y rápidos para proteger la salud pública, aunque las técnicas actuales son costosas y tienen limitaciones para la detección *in situ* (Supchocksoonthorn et al., 2021).

A nivel global, las Américas lideraron la importación de pesticidas en 2020, con 1,1 millones de toneladas por un valor de 6,9 mil millones de dólares. En ese año, la importación de desinfectantes aumentó un 160 % en comparación con el año anterior. La región aplicó más de 1 millón de toneladas de pesticidas anualmente en agricultura, con la tasa más alta de aplicación por hectárea (2,83 kg) y por persona (1,17 kg). En la última década el uso de herbicidas, fungicidas e insecticidas creció considerablemente, pasando de 362 a 852 kilotoneladas, de 93 a 177 kilotoneladas y de 159 a 181 kilotoneladas respectivamente, en comparación con años anteriores (FAO, 2022).

La necesidad de realizar detección de pesticidas de manera rápida y en el lugar de muestreo ha impulsado el desarrollo de biosensores portátiles. Estos dispositivos biotecnológicos permiten la detección *in situ* de residuos de pesticidas en muestras ambientales y alimentarias, facilitando el control de calidad y la toma de muestras en tiempo real (Kalyani et al., 2021). Si bien las técnicas cromatográficas tradicionales ofrecen alta precisión, presentan limitaciones en términos de tiempo de análisis, costo y complejidad operativa (Kumaran et al., 2022). Los biosensores por su parte aparecen como una alternativa para la detección de pesticidas, estos dispositivos aprovechan elementos biológicos para reconocer de manera específica moléculas de pesticidas, lo que

permite su detección incluso en bajas concentraciones (Kalyani et al., 2021; Verma & Bhardwaj, 2015).

Los biosensores son dispositivos compuestos por un receptor biológico y un transductor. El receptor biológico detecta sustancias específicas, mientras que el transductor convierte esta detección en una señal visible o eléctrica, haciendo la medición y lectura posibles. Gracias a su tamaño compacto y bajo costo, los biosensores pueden integrarse en redes de sensores extensas y representa una alternativa práctica frente a los métodos de análisis tradicionales, que suelen requerir equipos más complejos (Hahne et al., 2021; Wahid et al., 2023). Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un biosensor es un sistema autónomo que proporciona información analítica específica. Además de su alta sensibilidad y especificidad, los biosensores tienen la ventaja de medir únicamente los analitos biodisponibles, a diferencia de los sensores analíticos convencionales (Hahne et al., 2021; Wahid et al., 2023).

Una alternativa de biosensor bastante atractiva por su versatilidad y fácil manipulación es el uso de levaduras genéticamente modificadas. La biodetección por levaduras consigue identificar contaminantes en su entorno, que pueden encontrarse en el agua, aire, suelo y pueden ser perjudiciales para los ecosistemas y para la salud humana. La detección de estos contaminantes a tiempo es fundamental para prevenir problemas de toxicidad, disminución de la fertilidad y trastornos neurológicos. La levadura es efectiva como herramienta para biosensores por su rápido crecimiento, bajo costo, alta sensibilidad y adaptabilidad a pruebas en campo. Estas levaduras pueden detectar compuestos químicos específicos en su forma biodisponible, lo que las convierte en una opción valiosa para el monitoreo ambiental y la detección de problemas como la falta de oxígeno en cuerpos de agua (Jarque et al., 2016).

A diferencia de otros sensores *in vitro* basados en elementos biológicos no viables, los biosensores de levadura con células completas detectan compuestos en su forma biodisponible sin tratamiento previo. Las levaduras son adecuadas para aplicaciones *in situ* y pueden adaptarse a dispositivos portátiles, ya que requieren condiciones de crecimiento menos exigentes. En el caso de las células de levaduras, usando genes fluorescentes como el *Green Fluorescent Protein* (GFP), producen señales ópticas visibles en respuesta a los analitos objetivo (Wahid et al., 2023). La GFP es una herramienta esencial en la biología molecular, reconocida por su capacidad de emitir luz

verde bajo exposición a radiación UV. Su estructura contiene un cromóforo que genera esta fluorescencia verde, facilitando su uso en el marcado y seguimiento de proteínas, células y organismos vivos. La posibilidad de expresar GFP en diversos tipos celulares y organismos la convierte en una herramienta versátil y fundamental para la investigación científica (Ragon et al., 2023).

Dentro del contexto de la investigación en levaduras, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es considerada uno de los organismos modelo eucariotas más estudiados en biología molecular y celular. La cepa BY4742 es de las más utilizadas, debido a la disponibilidad de múltiples herramientas genómicas y moleculares, como deleciones de levadura y bibliotecas de genes etiquetados (Rossio et al., 2023). También se destaca como una variante de S288C diseñada específicamente para eliminar genes marcadores seleccionables comunes. Esta eliminación se realiza con el propósito de reducir o eliminar la homología con genes de vectores frecuentemente utilizados, sin afectar la expresión de genes vecinos (*Saccharomyces Genome Database*, 2024). A pesar de su amplia aplicación en numerosos laboratorios, no se ha realizado una comparación exhaustiva del proteoma de BY4742 con otros antecedentes genéticos. Las cepas de levadura empleadas en los laboratorios suelen ser auxotróficas, es decir, presentan mutaciones o deleciones en genes metabólicos de algunos aminoácidos y bases nitrogenadas, lo que permite seleccionar células transformadas con ADN exógeno que contiene copias funcionales de estos genes (Sherman, 2002). En el caso de *S. cerevisiae* cepa BY4742, esta presenta deleciones en los genes histidina (*his3*), uracilo (*ura3*), lisina (*lys2*) y leucina (*leu2*) (*Euroscarf - BY4742*, n.d.).

El gen YLR346C, también conocida como CIS1, es un gen no esencial y se encuentra en el cromosoma XII, produce una proteína localizada en la mitocondria, su regulación de factores de transcripción esta involucrados en la resistencia a fármacos pleiotrópicos, como Pdr1 y Yrr1p. Aunque la función biológica específica de YLR346C aún no se ha esclarecido, se sabe que los mutantes nulos de este gen presentan sensibilidad al estrés oxidativo, pero resistencia al ácido acético y láctico. Además, YLR346C se asocia con la resistencia a la citrinina y los *knockouts* de este gen son particularmente sensibles a este compuesto. El estudio del gen YLR346C podría proporcionar información para entender cómo responde a diferentes estímulos. Realizar estudios sobre YLR346C permitiría explorar su posible uso en detección de agentes externos como los pesticidas, haciéndolo un candidato interesante para su análisis como posible biosensor.

## **Justificación**

La creciente dependencia de pesticidas en la agricultura moderna, tanto para cultivos agrícolas como para control de plagas en entornos domésticos y jardinería, plantea serios riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Estos compuestos, aunque efectivos, tienen una alta toxicidad que con el tiempo llevan a enfermedades graves como trastornos reproductivos, disfunción neurológica, cáncer, etc. En Ecuador, el uso de pesticidas ha resultado en un preocupante número de casos de intoxicación, con un gran impacto en la salud de los trabajadores y comunidades cercanas a las zonas agrícolas.

Dada la necesidad de mejorar los métodos de detección de pesticidas, surge la idea de desarrollar soluciones más eficientes y accesibles. La investigación propuesta se centra en el análisis de la expresión del gen YLR346C en respuesta a pesticidas usados en Ecuador. Este gen, conocido por implicación en la resistencia a compuestos tóxicos, podría proporcionar una base para el desarrollo de un biosensor. Aunque su función biológica exacta no está definida se asocia con la resistencia a la citrinina y el estrés oxidativo, pudiendo así desempeñarse como detector de contaminantes químicos.

Los biosensores basados en levaduras presentan una solución prometedora. Como señala Ehtisham Wahid et al. (2023), se han desarrollado varios biosensores de levadura en etapas avanzadas de investigación que muestran un gran potencial para aplicaciones prácticas. Entre estos, se destacan dispositivos como Yestrosens, un biosensor portátil para detectar sustancias químicas disruptivas endocrinas, y un sistema para vigilancia de patógenos *in situ* que utiliza células de levadura para generar una respuesta visual mediante licopeno. Otro ejemplo es el Estramonitor, el cual ha demostrado eficacia en la detección de actividad estrogénica en aguas residuales, incluso en condiciones ambientales adversas (Wahid et al., 2023).

El desarrollo de un biosensor basado en YLR346C permitiría una detección rápida y sensible de pesticidas en altas dosis, tanto en alimentos como en ambientes agrícolas. Este biosensor no solo ofrecería una solución práctica y económica en comparación con otros métodos de análisis tradicionales, sino que también podría facilitar el monitoreo en tiempo real. La implementación de esta tecnología contribuiría significativamente a la protección de la salud pública y al fortalecimiento de prácticas agrícolas sostenibles.

Se considera que el impacto de este estudio es de gran potencial, ya que propone una herramienta innovadora para enfrentar un desafío crítico en la seguridad alimentaria y ambiental. Detectar de manera temprana y precisa la presencia de pesticidas ayudará a mitigar los riesgos asociados con su exposición, protegiendo tanto a consumidores como a los ecosistemas. Además, comprender mejor la función del gen YLR346C y su respuesta a los pesticidas puede abrir nuevas vías para el desarrollo de tecnologías de detección basadas en biotecnología, mejorando así nuestra capacidad para gestionar y reducir el impacto de contaminantes en cultivos y alimentos.

### **Hipótesis**

El gen YLR346C de *Saccharomyces cerevisiae* se expresa en respuesta a la presencia del pesticida pirimetanil, lo que permite su uso como base para el desarrollo de un biosensor capaz de detectar este pesticida en muestras ambientales.

### **Objetivos**

#### **Objetivo general:**

Diseñar un biosensor basado en el promotor YLR346C de *S. cerevisiae* para detección de pesticidas comúnmente utilizados en la agricultura ecuatoriana.

#### **Objetivos específicos:**

- Clonar el promotor YLR346C controlando la expresión de GFP en un plásmido de la levadura *S. cerevisiae*.
- Estimar el crecimiento de los cultivos de 35-pYLR346C a diferentes concentraciones de pirimetanil mediante la medición de densidad óptica (DO).
- Determinar la actividad del gen YLR346C en la levadura expuesta al pesticida pirimetanil mediante ensayos de fluorescencia.
- Evaluar la respuesta del promotor YLR346C frente a diferentes concentraciones de pirimetanil.
- Analizar los datos obtenidos de la expresión génica, identificando patrones de respuesta.

## Materiales y métodos

Los materiales y equipos utilizados para este estudio fueron puestos a nuestra disposición por parte de los laboratorios de la Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería de la Universidad de Investigación Experimental Yachay Tech. Los reactivos, kits de extracción y purificación empleados se adquirieron de distintas casas comerciales (HiMedia ®, Qiagen ®, Sigma-Aldrich ® Merck ®, Thermo Fisher Scientific ™). El pesticida “Lombardo” con principio activo de pirimetanil utilizado para el estudio, fue comprado en un distribuidor autorizado de productos agrícolas en Urcuquí, provincia de Imbabura.

**Tabla 1:** Marca y modelo de los equipos utilizados a lo largo de este estudio.

Equipos	Marca	Modelo
Termociclador	Applied Biosystems ™	Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers
Centrífuga	Thermo Fisher Scientific ™	SL40R
Cámara de electroforesis	BIO-RAD ®	Wide Mini-Sub Cell GT
Agitador orbital	Thermo Fisher Scientific ™	SHKE4450
Microscopio de fluorescencia	Leica ®	DM4000 B LED
Cabina de flujo laminar	Telstar ®	AV-30/70
Incubadoras	Thermo Fisher Scientific ™	IMP180 HERATHERM
Termoblock	Thermo Fisher Scientific ™	
Espectrofotómetro de micro volumen	Thermo Fisher Scientific ™	Nanodrop One Gene Pulser XCell Total System
Electroporador	BIO-RAD ®	
Vórtex	Heathrow Scientific ®	Vortexer ™
Micropipetas	Thermo Scientific ™	FINNPIPETTE F1

## Plásmidos y Cepas

El vector plasmídico pUG35, con una longitud de 6231 pb, fue seleccionado por ser un vector especializado en la clonación y expresión de genes bacterianos que incluyen

resistencia a ampicilina y un promotor MET17. Se eligió el vector pUG34 como control positivo, ya que permite comprobar el correcto funcionamiento del sistema de expresión de GFP. Este vector tiene una longitud de 6297 pb y incluye un gen de resistencia a ampicilina y el promotor MET17.

La cepa BY4742, derivada de *S. cerevisiae*, escogida como control negativo, es una de las más utilizadas y está diseñada para eliminar genes marcadores sin afectar la expresión de genes vecinos, es auxotrófica y presenta deleciones en los genes *HIS3*, *URA3*, *LYS2* y *LEU2*, estas deleciones favorecen el uso de vectores plasmídicos (BY4742 / SGD, n.d.). El genotipo de BY4742 es *MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0* (Mark & Salzbarg, 2022).

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , cepa bacteriana elegida por ser células capaces de maximizar la eficiencia de la transformación y producir ADN plasmídico de alta calidad (Anton & Raleigh, 2016).

**Tabla 2:** Plásmidos y cepas usados en el estudio.

Plásmido	Genotipo	Referencia
pUG35	URA3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3	(Niedenthal et al., 1996)
pUG34	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3	(Niedenthal et al., 1996)
BY4742	MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1leu2 $\Delta$ 0ura3 $\Delta$ 0	EUROSCARF
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1	(Casali & Preston, 2003)
35- <u>pYLR346</u>	pUG35, pYLR346C::yEGFP3	Este estudio

### Medios de Cultivo

Para el crecimiento de *E. coli*, se elaboró medio líquido y agar estéril de Luria Bertani (LB) el cual está compuesto por peptona de caseína y extracto de levadura. Esto proporciona al medio los nutrientes necesarios para un desarrollo óptimo de los microorganismos, al medio LB se agregó ampicilina (AMP).

**Tabla 3:** Componentes y concentraciones para realizar medio LB.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	5 g
Agar (solo para medio sólido)	15 g
Agua destilada	1000 mL

La tabla 4 describe los componentes y concentraciones necesarios para la preparación de medio rico YPD para cultivo de levadura.

**Tabla 4:** Componentes y composición de medio rico YPD para cultivo de levadura.

<b>Componente</b>	<b>Composición</b>
Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Dextrosa	20 g
Agar-Agar (solo para medio sólido)	15 g
Agua destilada	1000 mL

Tomado de (Sherman, 2002)

Para la preparación del medio mínimo YNB y la concentración de aminoácidos, se siguieron las indicaciones de (Sherman, 2002).

**Tabla 5:** Medio mínimo de YNB Dextrosa.

<b>Componente</b>	<b>Composición</b>
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos	6,7 g
Dextrosa	20 g
Agar - agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Tomado de (Sherman, 2002)

**Tabla 6:** Concentraciones de aminoácidos.

<b>Componente</b>	<b>Concentración Final (mg/L)</b>	<b>Stock (mg/mL)</b>
L-Lysine	30	10
L-Histidina	20	10
L-Leucina	60	10
Uracilo	20	2

Tomado de (Sherman, 2002)

### **Softwares de análisis de secuencia**

Para el análisis *in silico* se usaron las plataformas Benchling y SnapGene Viewer, aquí se diseñaron y validaron los esquemas de modificación en el vector pUG35, se retiró virtualmente la secuencia del promotor MET17 para posteriormente reemplazarla por el promotor escogido, YLR346C se identificaron los sitios de restricción adecuados para la deleción e inserción del nuevo fragmento. Además, se identificaron y diseñaron los primers específicos del promotor para la amplificación de la región objetivo.

La plataforma en línea Benchling (<https://www.benchling.com/>) es una herramienta integral basada en la nube, especializada en biología molecular e investigación científica biotecnológica. Ofrece una serie de herramientas que facilitan el diseño, la gestión y el análisis de datos experimentales. Entre sus principales características y funcionalidades se incluyen: la gestión de secuencias genéticas, permitiendo a los investigadores visualizar, anotar y manipular secuencias de ADN, ARN y proteínas con gran precisión; el diseño de experimentos, como la creación de primers y plásmidos; y la documentación y análisis de datos experimentales.

SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/>) es un software usado comúnmente para planificar, hacer simulaciones y documentación de experimentos de biología molecular, especialmente clonación de ADN. Permite visualizar y manipular secuencias de ADN de manera *in silico* haciendo que se detecte cualquier error antes de hacerlo *in vivo*.

## **Clonación**

Se realizaron las técnicas de clonación molecular según los protocolos descritos en (Sambrook & Green, 2012). Se amplificaron por PCR los fragmentos de ADN de interés, los cuales fueron posteriormente digeridos con las enzimas de restricción SacI y Sall. Los fragmentos resultantes se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se ligaron a los vectores previamente linealizados, incubando la reacción a 16 ° C.

La amplificación del promotor YL346c se realizó con los primers 5'SacI-pYLR346 y 3'Sall-pYLR346, diseñados en este estudio para flanquear la región de interés.

### **5'SacI-pYLR346**

5'CAAAGCTGGAGCTCGCAGTTAATGATTAATTGCATTGTTTTCC-3'

### **3'Sall-pYLR346C**

5'CATGTCGAGGTCGACTATTAAGGTGATAAATAATCCTTTGTTATTTGTGC  
CCC-3'

## **Electroporación de *E. coli* DH5α**

El proceso de electroporación de bacterias se basó en el protocolo presente en el manual de instrucción BIO RAD ® (BIO RAD, 2024). Se usó *E. coli* DH5α, que son células capaces de maximizar la eficiencia de la transformación y produce ADN plasmídico de alta calidad porque carece de la endonucleasa I no específica (endA1) (Anton & Raleigh, 2016). Además, mantiene los plásmidos de forma estable gracias a su bajo nivel de recombinación homóloga (recA1). También es eficiente para transformar ADN no metilado debido a la interrupción de la endonucleasa EcoKI (Anton & Raleigh, 2016). Se siembran las células transformadas en placas LB+AMP y se deja toda la noche a 37 ° C, los componentes usados para el medio LB se describen en la tabla 3.

## **Extracción y Purificación de ADN plasmídico**

Se aisló ADN plasmídico de colonias de *E. Coli* DH5α utilizando el kit comercial *GeneJet Plasmid Miniprep* de Thermo Scientific™, siguiendo las indicaciones del fabricante (Thermo Scientific, 2024). La calidad y concentración del ADN obtenido se verificaron mediante espectrofotometría.

Para linealizar el plásmido YLR346C, se realizó una digestión enzimática con las enzimas EcoRV y SacI. De igual manera, el vector pUG34 fue digerido con las enzimas EcoRI y SacI. En ambos casos, las reacciones de digestión se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l, cantidades descritas en la tabla 7. Este mix se puso en diferentes tubos eppendorf correctamente etiquetados y se los llevó al termociclador a 37 ° C durante 1 a 2 horas.

**Tabla 7:** Componentes y concentraciones de corte con enzimas.

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Concentración Final</b>
H <sub>2</sub> O	13.4	-
Buffer 10x	2.0	1x (final)
Enzimas x 2	0.2(c/u)	10 U/ $\mu$ L
RNasa A	0.2	1 $\mu$ g/ $\mu$ L
ADN plasmídico	4.0	0.5-1 $\mu$ g/ $\mu$ L

### **Electroforesis en gel de Agarosa del plásmido YLR346C**

La electroforesis se realizó para comprobar que el plásmido fuese el correcto. Los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión enzimática se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, intercalante bromuro de etidio. Se prepararon 500 mL de 10x Tris-Acetato-EDTA (TAE), comprendiendo 24 g de Tris base, 5,75 mL de ácido acético, 1,86 g de Ácido EtilenDiaminoTetraAcético (EDTA) disódico y 500 mL de agua estéril, y se ajustó su pH a 8. Todo esto se diluyó a 1x – 10 mL de TAE en 100 mL de agua. Para el gel se prepararon 100 mL, compuesto de 1 g de agarosa y 100 mL de buffer TAE 1x. Se calentó en el microondas, ya tibio se añadieron 5  $\mu$ l de Bromuro de etidio. Se cargaron en el gel de electroforesis 8  $\mu$ l de muestra con 1,2  $\mu$ l de buffer de carga, y un ladder de 1 kb.

### **Electroporación de Levaduras**

Para las células competentes se utilizó la levadura de *S. cerevisiae* cepa BY4742. Se cultivó en medio rico YPD a 30 ° C con agitación orbital a 135 rpm, siguiendo las proporciones descritas en la tabla 4, y se prosiguió con la electroporación.

El proceso de electroporación de levaduras *S. cerevisiae* se basó en el protocolo de BIO RAD®, anexo 2, sección 7. Se inoculó una colonia en 10 mL de medio YNB con glucosa, complementado con los aminoácidos histidina (his), leucina (leu), lisina (lys) y bases nitrogenadas y se incubó a 30 ° C y 160 rpm durante toda la noche para obtener un cultivo de alta densidad. Posteriormente, la concentración celular se ajustó de acuerdo con las recomendaciones del protocolo de electroporación (BIO RAD, 2024). Tras la electroporación, se sembraron las levaduras en placas con medio YNB sólido como se describe en la tabla 5. Se le añadió glucosa y los aminoácidos especificados en la tabla 6 para la cepa BY4742.

### **Exposición a pesticidas a diferentes concentraciones y curvas de crecimiento**

Se cultivaron las células en YNB toda la noche. Al día siguiente se efectuó la medición en el Nanodrop®, se hizo una dilución y se verificó que la Densidad Óptica (DO) a 600 nm se encontrara en 0,2 nm. Obtenida dicha medida, a partir de las 2 horas se midió nuevamente, hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0,4 nm la cual nos indicó que las células estaban en crecimiento logarítmico. Con esto se agregó el pesticida a diferentes concentraciones. Se estableció un control sin pesticida (C-), y cinco concentraciones de pirimetanil que fueron: C5, C10, C15, C20 y C110 mg/mL, cada concentración tenía 4 µl, 8 µl, 12 µl, 16 µl y 88 µl del pesticida respectivamente.

Durante 10 horas se realizaron mediciones cada 2 horas, se tomó una medida en el Nanodrop®, estableciendo la primera medición después de la exposición al pesticida. Las DO<sub>600</sub> obtenidas de cada concentración y del control permitieron establecer las curvas de crecimiento. Las gráficas y cálculos correspondientes se efectuaron en el programa Microsoft Excel.

### **Fijación de placas para observación en el microscopio**

La fijación de las placas se efectuó después de la exposición con pirimetanil. Se colectaron todas las células y se centrifugaron a 6073 rpm por 5 minutos, se descartó el medio y se resuspendió con agua. Se volvió a centrifugar y se descartó el agua. Luego se resuspendió las células en 30 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y 70 µl

de metanol (MetOH) helado por 15 minutos. Finalmente, se centrifugó a 2000 rpm por un minuto, se descartó el medio y se lavó con PBS.

Se colocaron 1,5 µl de cada concentración de las muestras obtenidas durante la fijación para placas, correspondiente a cada hora de recolección, sobre portaobjetos debidamente etiquetados para observar la presencia de fluorescencia en las levaduras mediante microscopía. Se tomaron fotografías de tres cuadrantes diferentes, pero dentro del mismo recuadro. Estas imágenes se llevaron al programa Fiji (ImageJ) donde se realizó una eliminación del ruido, con el fin de facilitar el análisis de las imágenes, ya que esto podía interferir con la identificación y cuantificación de las levaduras, reduciendo errores en el procesamiento.

Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>) es una extensión de ImageJ, un software de procesamiento y análisis de imágenes, utilizado en investigación científica. Fiji incluye varios plugins y herramientas adicionales que no se encuentran en la versión estándar de ImageJ.

### **Análisis Estadístico en RStudio**

El software RStudio (<https://posit.co/>) es un entorno de desarrollo integrado para el lenguaje de programación R. Está diseñado para hacer más fácil la programación y proporciona herramientas para visualizar, analizar y documentar datos estadísticos y científicos.

Para evaluar los efectos de las diferentes concentraciones de pesticida en los diferentes tiempos sobre las muestras de levadura, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de post-hoc de Dunnett en RStudio.

Se realizó la preparación de datos para tener un formato adecuado para el análisis, con las concentraciones de pesticida (Control, C5, C10, C15, C20, C110) como variables independientes y las medidas obtenidas en diferentes tiempos (Tiempo 0, Tiempo 2, Tiempo 4, Tiempo 6, Tiempo 8 y Tiempo 10) como variables dependientes.

Se importaron los datos de Microsoft Excel a RStudio para proceder a realizar el ANOVA y así determinar si había diferencias significativas en las medidas entre las diferentes concentraciones de pesticida. Se usó la prueba Post-hoc de Dunnett para identificar qué concentraciones diferían del grupo control.

## **Resultados**

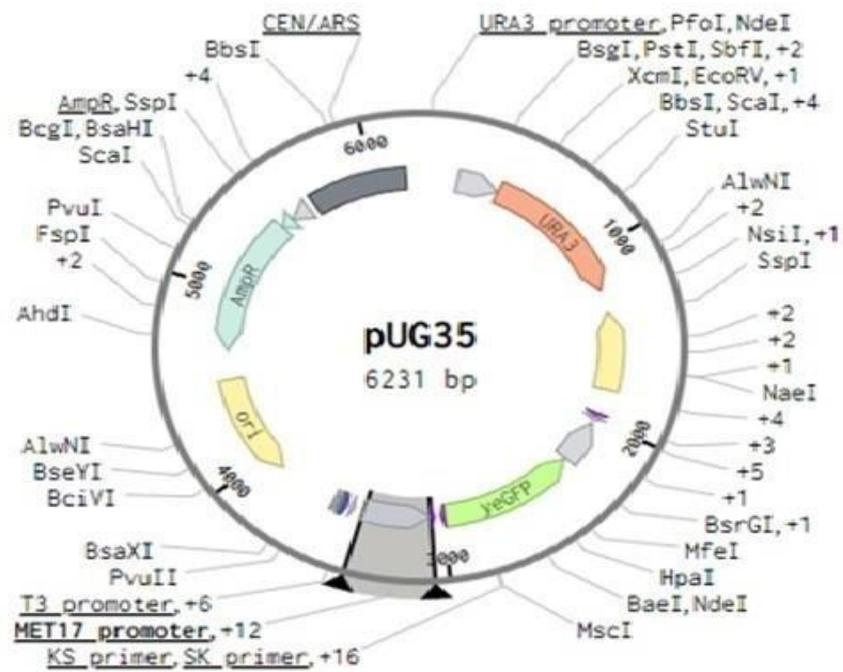
Ante la necesidad de mejorar los métodos de detección de pesticidas, surgió la propuesta de desarrollar soluciones más eficaces y accesibles. A través de técnicas de biología molecular se clonó el promotor del gen YLR346C junto a un gen reportero para el desarrollo de un biosensor.

Primeramente, para seleccionar el plásmido de interés se tomó como guía (Gil, et al. 2014), en donde expone que YLR346C es un gen con alta respuesta al estrés por lo que tiene una reacción sensible a la exposición de pesticidas como pirimetanil.

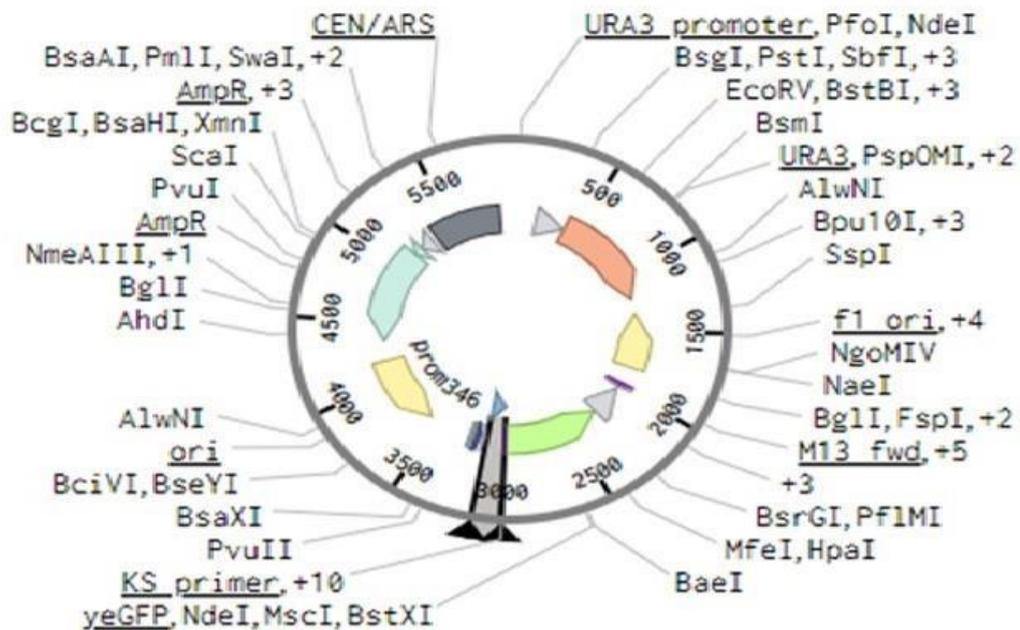
### **Análisis Bioinformático del vector plasmídico pUG35 y vector recombinante 35-YLR346C**

Dentro del análisis *in silico* se usó el vector plasmídico pUG35, con una longitud de 6231 pb, un vector especializado en la clonación y expresión de genes bacterianos que incluye resistencia a ampicilina y un promotor MET17. En el análisis, se realizó una delección del promotor MET17 y se insertó el gen YLR346C en el sitio de delección.

En la figura 1 se muestra el mapa de restricción del vector original pUG35 (A) y del vector recombinante 35-YLR346C (B). Como se puede observar, la principal diferencia entre los mapas es en la región del promotor. En el mapa de la figura 1 (B) el promotor MET17 ha sido reemplazado por el promotor YLR346C. Esta modificación se llevó a cabo mediante digestión con las enzimas de restricción SacI y Sall, seguida de la ligación del fragmento de ADN que contiene el promotor YLR346C.



**Figura 1 (A):** Mapa del vector pUG35 con un tamaño de 6231 pb, realizado in silico mediante el programa bioinformático Benchling. Marcado en color morado se encuentra el promotor MET17.



**Figura 1 (B):** Mapa del vector con la inserción del promotor 35-pYLR346C con un tamaño de 5915 pb. Mapa realizado en el programa bioinformático Benchling. Se observa seleccionado en color morado la inserción del promotor YLR346C.

### **Clonación del Promotor YLR346C en el vector pUG35**

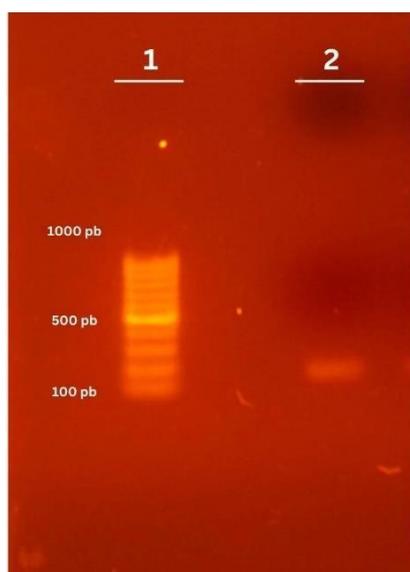
Se amplificó un fragmento de 153pb correspondiente al promotor YLR346C mediante PCR, utilizando ADN genómico de *S. cerevisiae* como molde. Los primers diseñados específicamente para esta región incluían sitios de restricción SacI en el extremo 5' y SalI en el extremo 3', permitiendo la posterior clonación en el vector.

### **Amplificación del fragmento clonado de YLR346C**

La amplificación se realizó mediante las condiciones estandarizadas de PCR expuestas en la tabla 8, y el amplicón obtenido se puede visualizar en la figura 2.

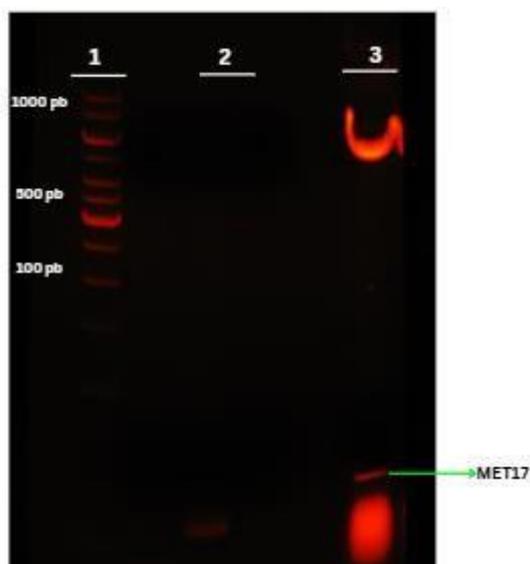
**Tabla 8:** Condiciones de PCR estandarizadas para amplificar el fragmento clonado de YLR346C

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95 ° C	1 minuto	1
<b>Desnaturalización</b>	95 ° C	30 segundos	25
<b>Alineación de primers</b>	52 ° C	1 minuto	25
<b>Extensión</b>	72 ° C	30 segundos	25
<b>Extensión final</b>	72 ° C	4 minutos	1



**Figura 2:** Amplificación por PCR del promotor YLR346C. Columna 1: Marcador de peso 1kb (Thermo Fisher <sup>TM</sup>). Columna 2: Banda de amplificación promotora YLR346C. Gel de agarosa al 1 %, intercalante bromuro de etidio

El vector pUG35 fue digerido con las mismas enzimas (SacI y SalI), lo que liberó el promotor MET17 y generó extremos compatibles para la inserción del promotor YLR346C.



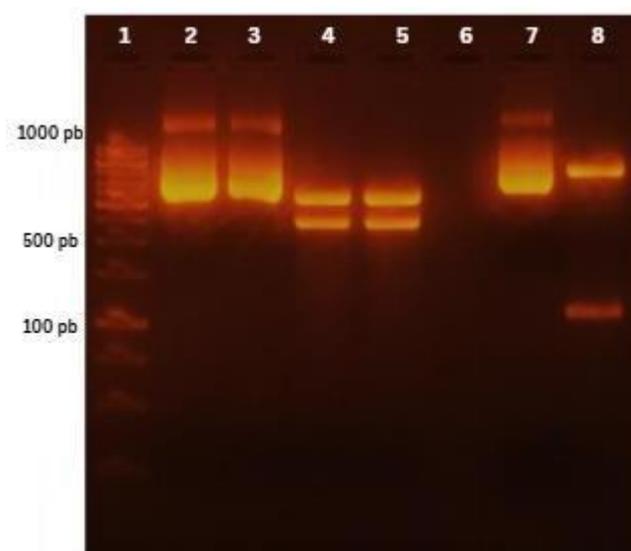
**Figura 3:** Gel de confirmación previo a purificación de fragmentos de ADN. Gel de agarosa al 1 % intercalante bromuro de etidio. Carril 1: Marcador 1 kb, carril 2: PCR digerido con enzimas SacI y SalI, carril 3: pUG35 digerido con enzimas SacI y SalI liberando el promotor que se quiere eliminar.

Posteriormente, se realizó una reacción de ligación entre el vector linealizado y el fragmento amplificado por PCR, ambos cortados con las enzimas SacI y SalI. Con esta ligación se obtuvo el plásmido recombinado 35-YLR346C, que permite la expresión de GFP bajo el control del promotor YLR346C.

### **Screening de clones correctos de ligación**

La figura 4 presenta los resultados de la electroforesis del screening correspondiente a la ligación 35-YLR346C. La digestión con las enzimas de restricción fue realizada junto con el control positivo pUG34, este análisis confirmó que clones estaban correctos.

El análisis de restricción de 35-YLR346C (5915 pb) con las enzimas SacI y EcoRV, generó fragmentos de 3393 pb y 2522 pb, mientras que el control positivo pUG34 (6297 pb) fue digerido con SacI y EcoRI, produciendo fragmentos de 1142 pb y 5124 pb.



**Figura 4:** Registro fotográfico de electroforesis del ADN plasmídico y cortes con enzimas. Se muestra en el carril 1 el marcador de peso de 1 kb de Thermo Fisher Scientific™, carril 2 y 3: ADN plasmídico del vector 35-YLR346C, carril 4 y 5: corte enzimático de 35-YLR346C con las enzimas SacI y EcoRI, carril 7: ADN plasmídico del vector pUG34-control, carril 8: corte enzimático del vector pUG34-control con las enzimas EcoRV y SacI. Gel de agarosa al 1 %, intercalante bromuro de etidio.

## Secuenciación del promotor 35-YLR346C

La figura 5 indica la secuencia obtenida mediante el método de secuenciación de Sanger, en color violeta se presenta el promotor de interés YLR346C. En color verde se encuentra la secuencia de GFP, en color rojo y azul se observan las secuencias de reconocimiento de las enzimas SacI y Sall. Cabe mencionar que el promotor YLR346C fue determinado por la plataforma de promotores eucariontes (*EPD - YLR346C\_1 Viewer*, n.d.).

```
CGGGCTGCCGGCGGCAATTAACCCTCACTAAAGGGACAAAAGCTG GAGCTCGCAGTTAATGATTAAATTGCA
TTGTTTTCTTGTTCCTTTCTGTTATACCTGTCGAATTAACATAAAAGTGTATATGAATTTAAGGGGCACAA
ATAACAAAGGATTATTTATCACCTTTAATAGTCGACCTCGACATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCAGTGGT
GTTGTCCCAATTTTGGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAA
GGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATTGCCAGTTCATGGCCAA
CCTTAGTCACTACTTTTCGGTTATGGTGTTCATGTTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTT
TTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTATTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAA
GACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAGGTTATTGATTTTAA
AGAAGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACAACATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGA
CAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGTCTGTTCAATTAGC
TGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGTGATGGTCCAGTCTTGTACCAGACAACCATTACTTATCCACT
CAATCTGCCTTATCAAAGATCAAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTGTAGAAATTTGTTACTGCTGCT
GGTATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAATAACTGGTTCGAGTCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTAC
ATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTA
TTTTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGAC
GCGTGACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAAAAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATT
TGCGGCCGGTACCC
```

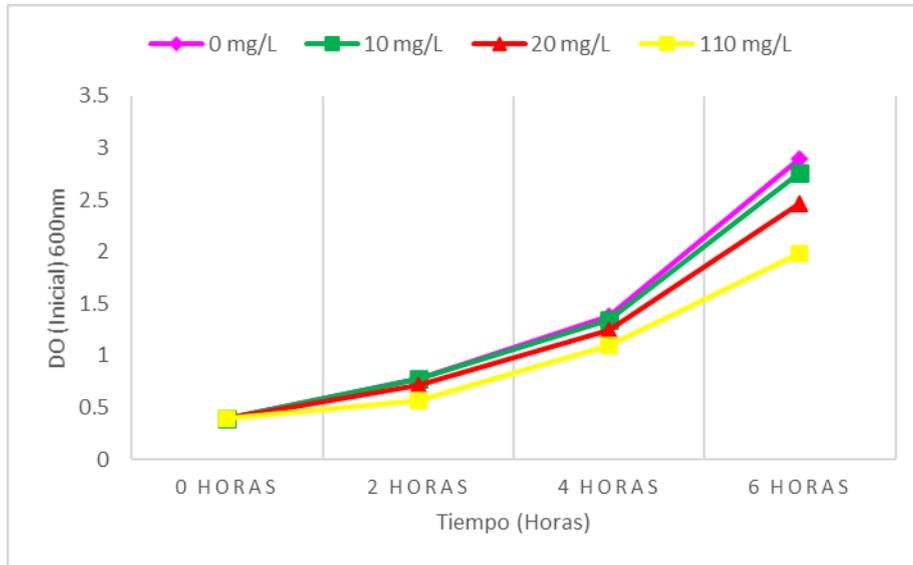
**Figura 5:** El secuenciamiento del constructo 35-YLR346C confirmó la ligación correcta. Puede observarse en rojo y azul los sitios de restricción correspondientes a las enzimas SacI y Sall, respectivamente. En rosado se señala el fragmento del promotor YLR346C clonado. El cuadrado gris indica el codón de inicio (ATG) de la GFP, cuya secuencia codificadora completa está resaltada en verde y el codón de terminación (TAA) está resaltado dentro de un recuadro. La región subrayada representa la secuencia terminadora.

## Curvas de Crecimiento de levaduras expuestas a pesticida

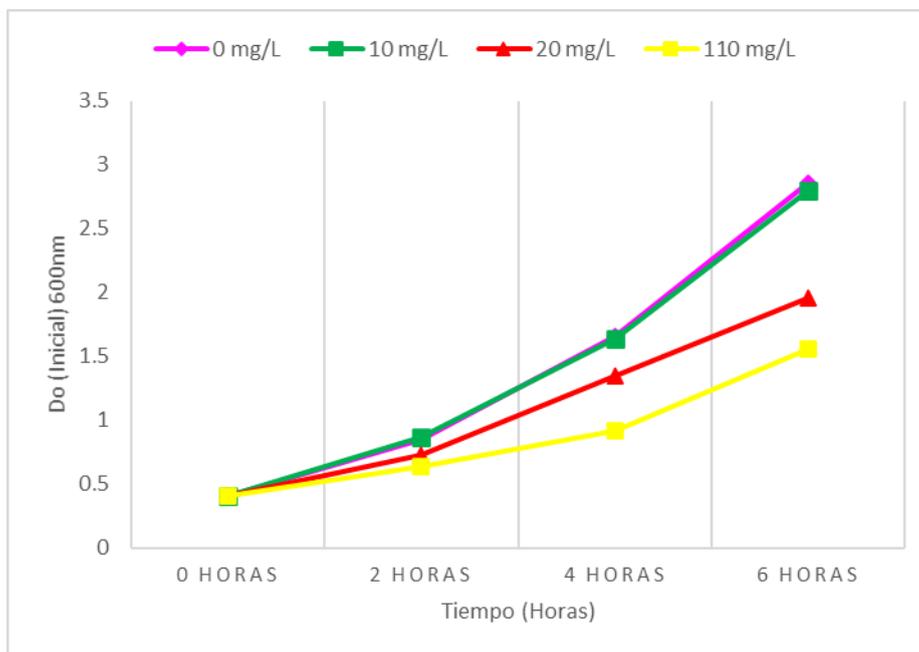
Las figuras 6, 7 y 8 presentan las curvas de crecimiento obtenidas a partir de tres replicas experimentales, las cuales muestran el efecto de distintas concentraciones de pesticida sobre las levaduras durante diferentes tiempos de exposición.

Los diferentes gráficos de curvas de crecimiento muestran que tanto el tiempo como las distintas concentraciones de pesticida influyen en el crecimiento de las levaduras. Las levaduras expuestas a mayores concentraciones de pesticida (C20 y C110) tienen un crecimiento más lento en comparación con el control. Aunque las concentraciones más altas ralentizan el crecimiento de las levaduras, se observa que siguen creciendo, aunque

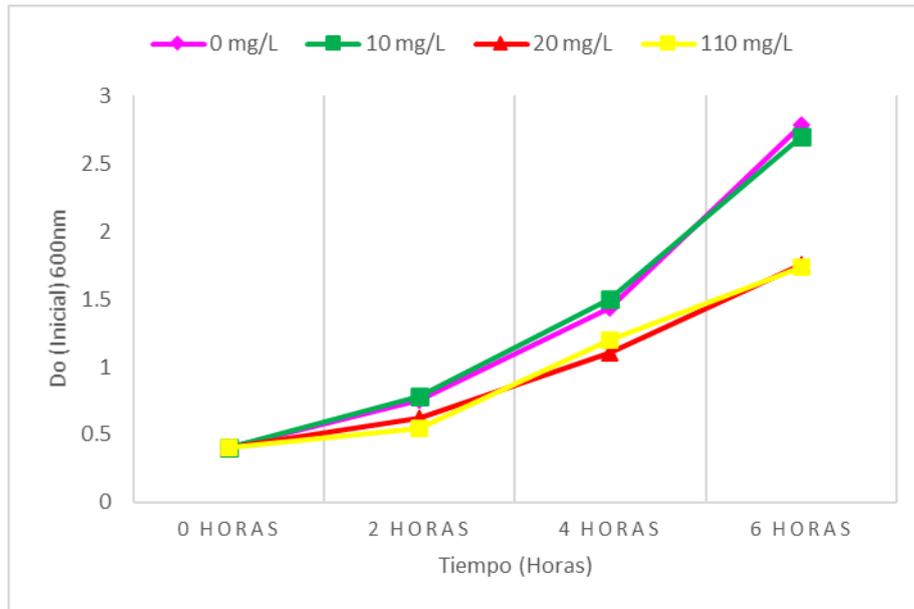
a un ritmo más lento. Por otro lado, las levaduras del control y aquellas expuestas a la concentración C10 tienen un crecimiento similar, lo que sugiere que esta concentración no afecta en gran medida su desarrollo durante el tiempo de observación.



**Figura 6:** Curva de crecimiento del cultivo de levaduras expuestas al pesticida pirimetanil a diferente concentración y tiempo, día 1.



**Figura 7:** Curva de crecimiento de levaduras expuestas a pesticida pirimetanil con diferente concentración y tiempo, día 2.



**Figura 8:** Curvas de crecimiento de levaduras expuestas a pesticida pirimetanil con diferente concentración y tiempo, día 3.

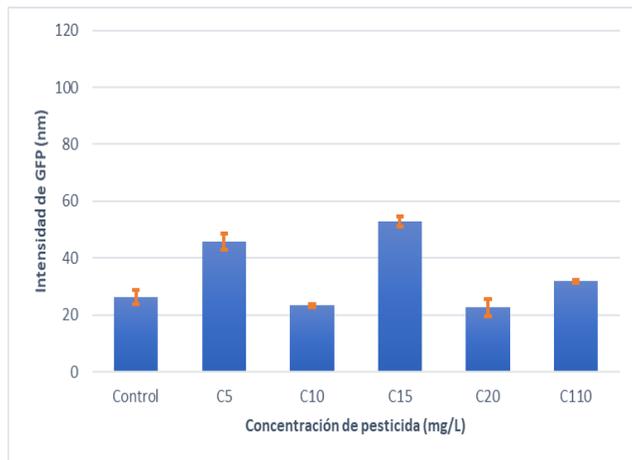
### Análisis de intensidad de GFP

En las figuras 9, 10 y 11 se muestra los cambios de la intensidad de GFP a lo largo del tiempo, bajo diferentes concentraciones de pesticida. La intensidad del GFP es usado como un indicador biológico para evaluar los efectos del pesticida sobre la expresión del gen YLR346C.

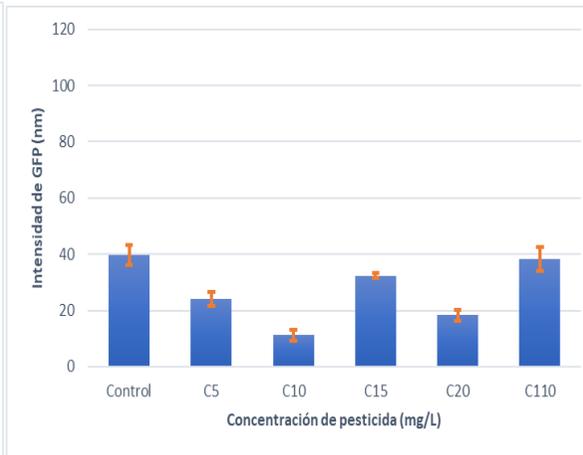
En la figura 9, que presenta tres gráficos de barras (A, B y C), se observa cómo varía la intensidad de la fluorescencia a diferentes concentraciones de pesticida y tiempos. En el grafico A (0 horas), se muestra una ligera variación de fluorescencia en las concentraciones C5 y C15. En el grafico B (2 horas), se aprecia que el control muestra un aumento en la fluorescencia comparado con las muestras expuestas a pesticida. Sin embargo, en el grafico C (4 horas), la fluorescencia del control disminuye, mientras que las muestras con pesticida, especialmente las concentraciones más altas, presentan un aumento. Esto podría indicar que, en las primeras horas de exposición, las células están intentando adaptarse al medio, lo que provoca una diferencia en la intensidad de fluorescencia. En cuanto a la barra de error elevada para la concentración C110 en las 4 horas, esto podría sugerir dos posibles problemas: muerte celular debido a la alta concentración de pesticida o una alta DO que podría generar lecturas poco confiables.

La figura 10 presenta tres gráficos (A, B y C) correspondientes a 6 horas, 8 horas y 10 horas. En estos gráficos se observa que el control no supera a las muestras con pesticida y mostrando una intensidad más elevada en las concentraciones más altas conforme pasa el tiempo. Cabe recalcar que en la mayoría de estos resultados sobresale la concentración C15.

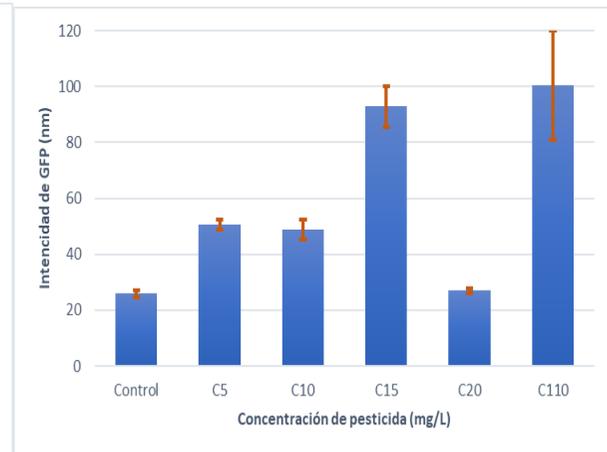
En la figura 11, se presentan dos gráficos (A y B) correspondientes a las 4 horas y 6 horas. En ambos gráficos, se observa que las concentraciones muestran valores similares, lo que podría ser resultado de una variación o error en el ensayo realizado el día 3.



(A)

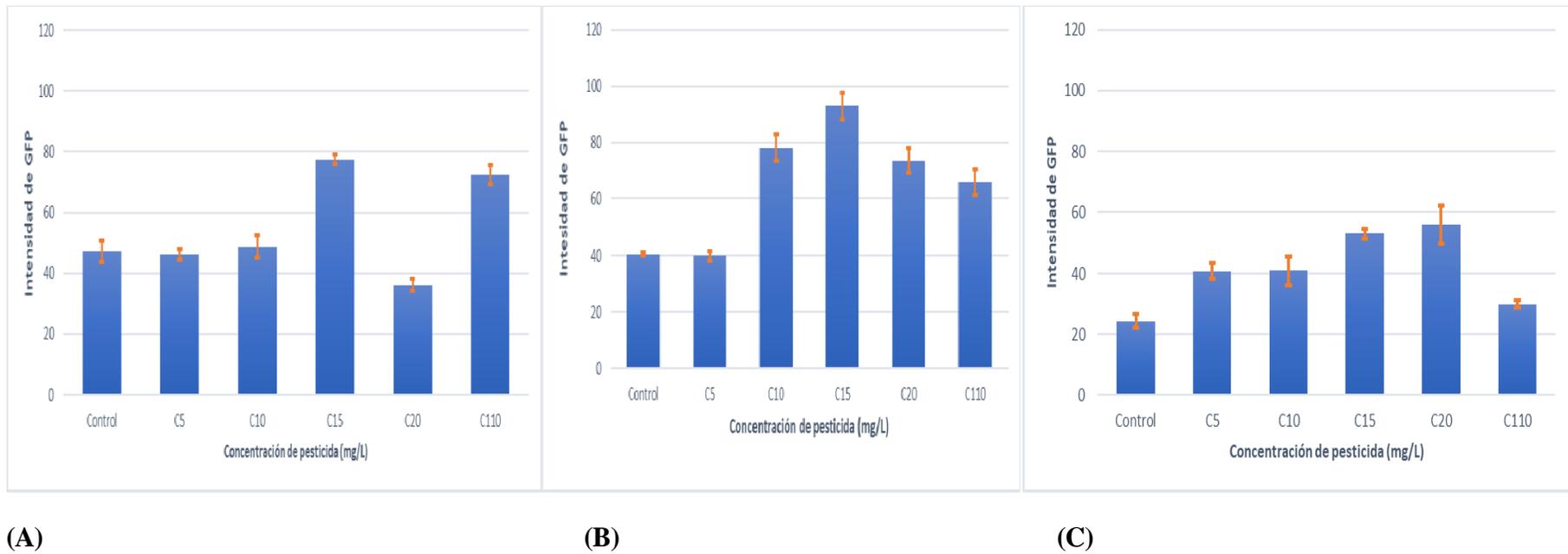


(B)

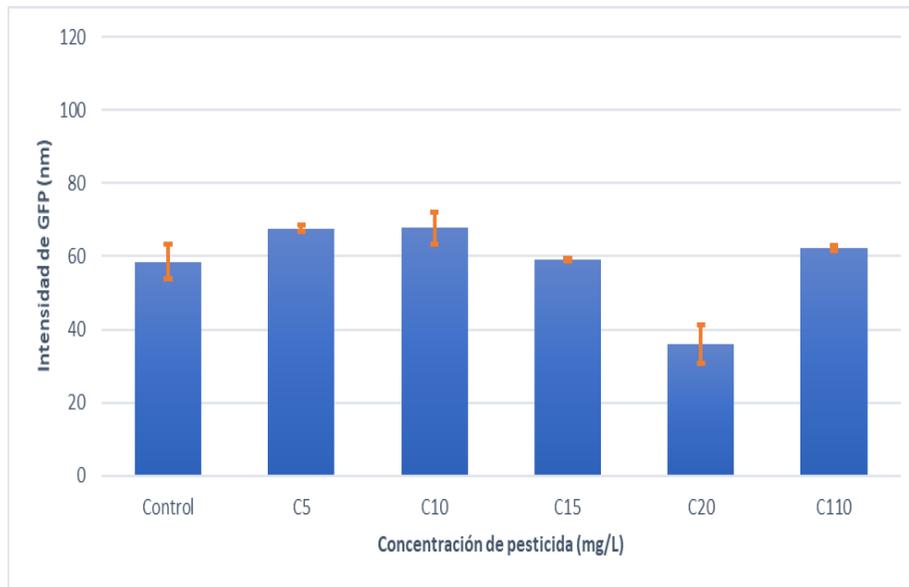


(C)

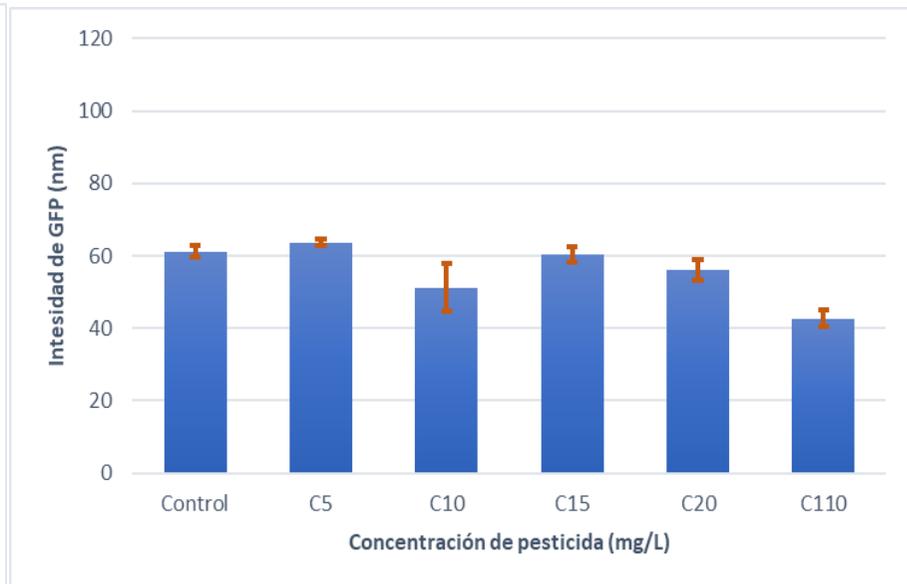
**Figura 9:** Gráficos de Intensidad de GFP en función del tiempo y concentración de pesticida, día 1. Gráfico A, intensidad de GFP a 0 horas; gráfico B, intensidad de GFP a 2 horas; gráfico C, intensidad de GFP a 4 horas.



**Figura 10:** Gráficos de Intensidad de GFP en función del tiempo y concentración de pesticida, día 2. Gráfico A, intensidad de GFP a 6 horas; gráfico B, intensidad de GFP a 8 horas; gráfico C, intensidad de GFP a 10 horas.



**(A)**



**(B)**

**Figura 11:** Gráficos de Intensidad de GFP en función del Tiempo y Concentración de pesticida, día 3. Gráfico A, intensidad de GFP a 4 horas, gráfico B, intensidad de GFP a 6 horas.

## **Microscopia de Fluorescencia de 35-YLR346C**

En los resultados obtenidos de la observación de placas fijadas se obtuvieron varias fotografías de microscopía en diferentes campos de las placas, a diferentes concentraciones y tiempos.

En la figura 12 (A), se observan las células expuestas a diferentes concentraciones en el tiempo cero. Como se muestra, el control no presenta fluorescencia, mientras que a las concentraciones C15 y C110 se registra un mayor índice de fluorescencia, a pesar del corto tiempo de exposición. Esto puede deberse, como se ha mencionado antes, a que las células están intentando adaptarse al medio.

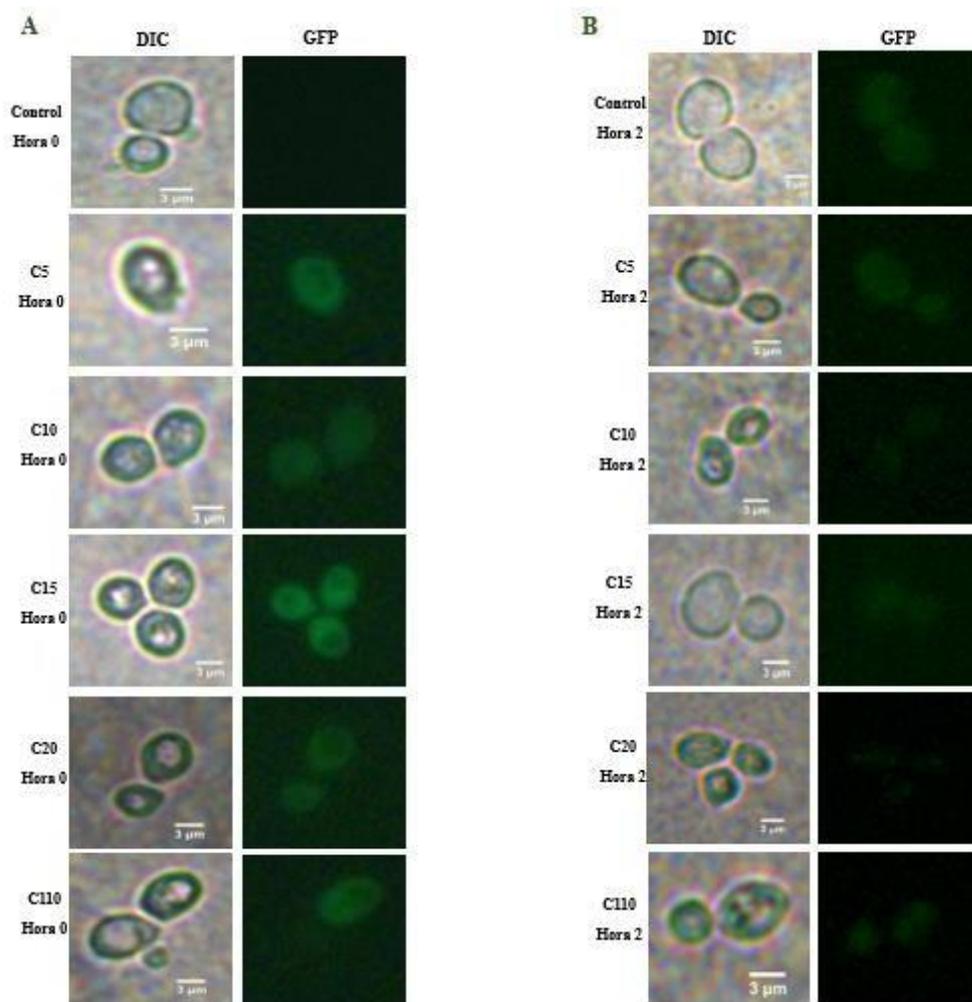
En la figura 12 (B), correspondiente a las dos horas, el control sigue sin mostrar fluorescencia, lo cual es coherente, ya que no contiene pesticida. Sin embargo, en la concentración C110, se observa una menor expresión por lo que se necesitaría experimentos futuros para confirmar los datos.

En la figura 13 (A) se muestran los cultivos expuestos a distintas concentraciones a las cuatro horas. En este punto, todas las concentraciones presentan fluorescencia, con una mayor intensidad en la C110. Al observar varios campos, notamos que, aunque la fluorescencia es visible, solo un número reducido de células la presentan. En la figura 13 (B), correspondiente a las seis horas de exposición, las células parecen estar adaptadas al medio, ya que en su mayoría se presenta fluorescencia.

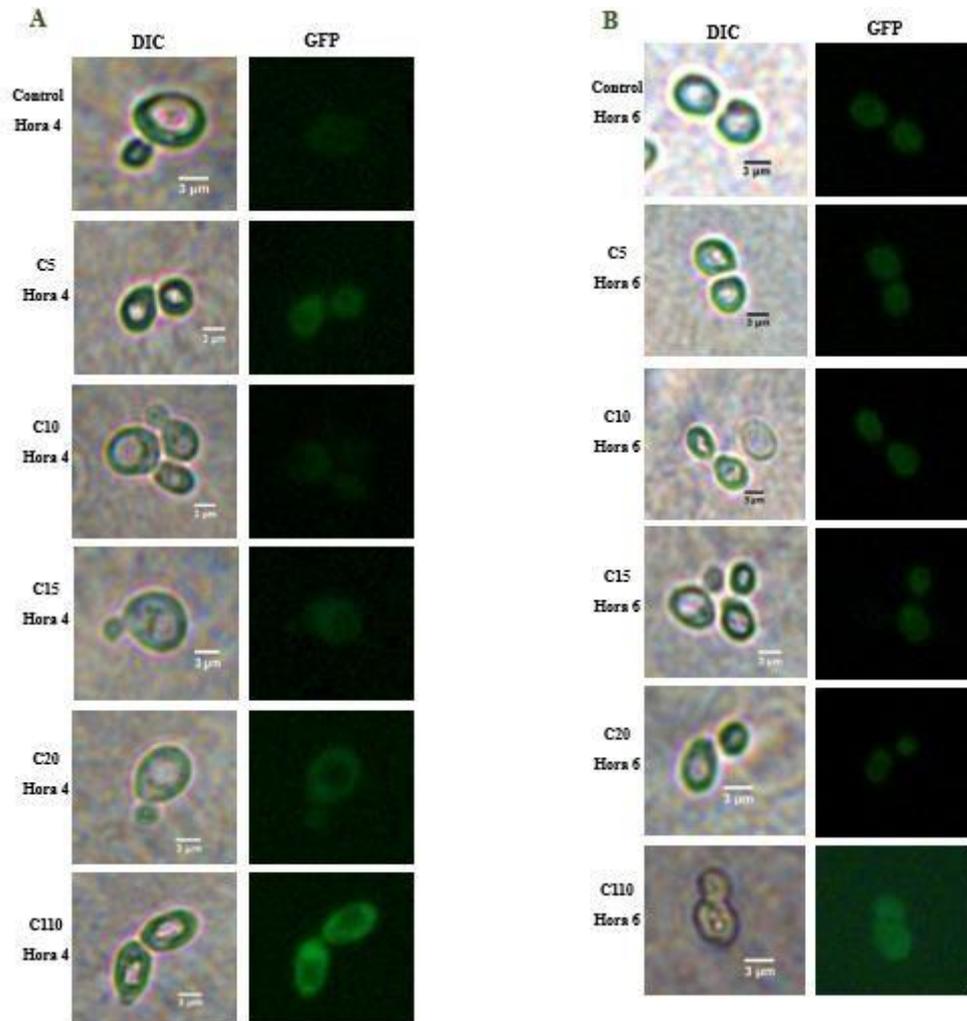
En la figura 14 (A), a las 8 horas de exposición, se presenta un aumento gradual de la intensidad de fluorescencia a medida que aumenta la concentración del pesticida siendo más evidente desde la C10 a la C110. Finalmente, en la figura 14 (B), a las 10 horas, se observa que se mantiene la expresión de GFP inducida por la exposición al pesticida, aunque se detecta una ligera disminución en la intensidad en comparación con el tiempo de 8 horas. Este efecto podría estar influenciado por el aumento del fondo de fluorescencia verde, probablemente debido a la configuración del microscopio, como la ganancia y el tiempo de exposición, que pueden generar una señal de fondo más intensa e interferir con la detección del GFP. Se podría decir que, las horas en las que se registró una mayor intensidad de fluorescencia fueron entre las 4 y 8 horas. Durante este periodo, el control presento una leve fluorescencia, lo que podría deberse al estrés provocado por el tiempo de exposición y la disminución de nutrientes hacia el final del experimento. Esto puede provocar cierta fluorescencia, aunque en menor nivel que las células expuestas a

pirimetanil. En particular, las concentraciones C15 y C110 mostraron una intensidad alta de fluorescencia, lo que podría indicar que las células están activando respuestas de estrés ante estas concentraciones más elevadas. Esto sugiere que la concentración de respuesta para la activación del promotor YLR346C podría estar entre estas concentraciones. Después de las 10 horas y con una  $DO_{600}$  superior a 2, se ve una disminución en el crecimiento de las células. Una densidad óptica tan alta indica que el mayor porcentaje de las células han alcanzado la fase estacionaria o están entrando en la fase de muerte.

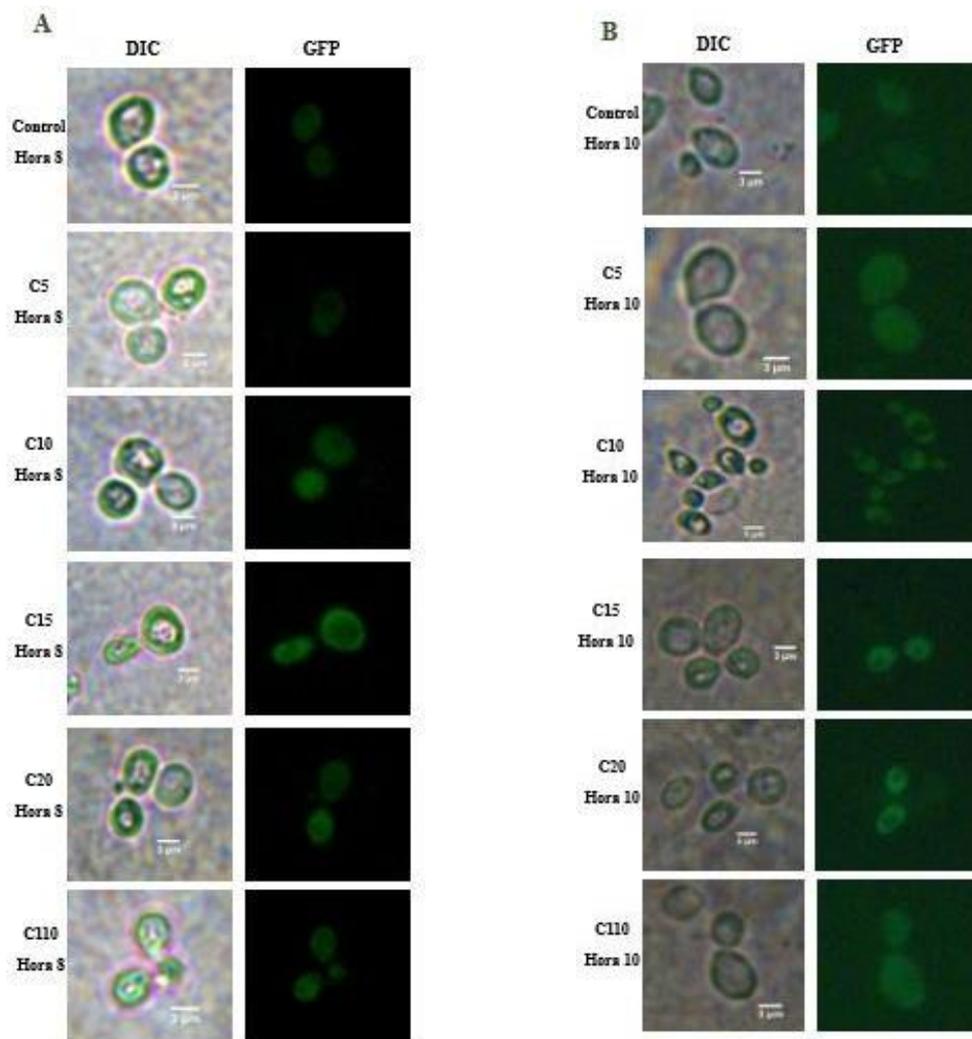
La fluorescencia observada podría estar relacionada con la expresión del gen reportero GFP, controlado por el promotor YLR346C, que se activa en respuesta a la presencia de pirimetanil. Las células observadas reaccionan incrementando la producción de proteínas fluorescente GFP.



**Figura 12:** Microscopía: (A) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de exposición al pesticida tomadas a las 0 horas. (B) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de pesticida capturas a las 2 horas.



**Figura 13:** Microscopía: (A) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de exposición al pesticida tomadas a las 4 horas. (B) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de pesticida capturas a las 6 horas.



**Figura 14:** Microscopía: (A) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de exposición al pesticida tomadas a las 8 horas. (B) Fotografías de las células a diferentes concentraciones de pesticida capturas a las 10 horas.

### Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron de forma independiente, tres veces. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y test de Dunnett. El nivel de significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

### ANOVA de dos vías para evaluar el efecto de concentración de pesticida y tiempo de exposición.

El análisis de varianza de dos vías mostró que tanto la concentración del pesticida ( $F = 3,84$ ,  $Pr = 0,00306$ ) como el tiempo de exposición ( $F = 12,622$ ,  $Pr = 1,17 \times 10^{-9}$ ) tuvieron un efecto significativo sobre la expresión de YLR346C. Esto indica que a medida que

aumenta la concentración del pesticida o el tiempo de exposición, se observa un incremento en la expresión de este gen, lo que sugiere un aumento en el estrés celular. Además, se observa una interacción entre ambos factores ( $F = 1,85$ ,  $Pr = 0,02223$ ), indicando que la respuesta de YLR346C al pesticida depende tanto de la concentración como del tiempo de exposición.

**Tabla 9:** Resultados de ANOVA realizados en RStudio.

	F value	Pr(>F)	
Concentración	3,84	0,00306	**
Tiempo	12,622	$1,17 \times 10^{-9}$	***
Concentración: Tiempo	1,785	0,02223	*

**Signif.cDOes:** 0 ‘\*\*\*’; 0.001 ‘\*\*’; 0.01 ‘\*’; 0.05 ‘.’; 0.1 ‘ ‘ 1

### Test de Dunnett

En el análisis de Dunnett realizado en RStudio se comparan los diferentes grupos de tiempo y concentración respectivamente con un tiempo 0 y un grupo control. Las columnas “diff” representan las diferencias de medias entre cada grupo y el control, y las columnas “pval” representan los valores p ajustados.

En efecto de Tiempo se observaron diferencias entre el tiempo T0 y los tiempos T4 y T8, sugiriendo que la expresión del gen cambia a partir de cierto tiempo de exposición. No se encuentran diferencias entre T0 y T2, lo que indica que, en las primeras etapas de la exposición, la expresión del gen no se ve afectada de manera significativa.

En el caso de la concentración se vio una diferencia entre el control y la concentración C15, esto nos podría indicar que la concentración C15 tiene un efecto significativo sobre la expresión del gen. No se observan diferencias que sean significativas en el resto de concentraciones.

**Tabla 10:** Resultados de los análisis en RStudio, Test de Dunnett comparando Tiempo y Concentración.

<b>Tiempo</b>	<b>diff</b>	<b>pval</b>	
T0-T2	-3,830556	0,9226	
T0-T4	20,241389	0,00018	***
T0-T6	19,417713	0,00043	***
T0-T8	24,212407	0,00013	***
T0-T10	18,510185	0,00442	**
<b>Concentración</b>	<b>diff</b>	<b>pval</b>	
Control - C5	5,967083	0,6945	
Control - C10	6,74125	0,5898	
Control - C15	17,749444	0,0054	**
Control - C20	4,200736	0,8971	
Control -C110	8,577778	0,3601	

**Signif.cDOes:** 0 ‘\*\*\*’; 0.001 ‘\*\*’; 0.01 ‘\*’; 0.05 ‘.’; 0.1 ‘ ‘ 1

## Discusión

Esta investigación se enfoca en analizar la expresión del gen YLR346C en respuesta al pirimetanil, uno de los pesticidas comúnmente utilizados en Ecuador. Se evaluó el efecto de la concentración del pesticida y el tiempo de exposición sobre la activación de este gen, utilizando GFP como gen reportero. Los resultados muestran un aumento sutil en la fluorescencia celular a medida que se incrementa la concentración de pirimetanil.

Durante las primeras horas de exposición, la fluorescencia fue baja, probablemente debido a una fase de ajuste celular al estrés. Posteriormente, se observa un incremento de fluorescencia, reflejando la activación del sistema. Además, se identificó que la concentración C15 actúa como un punto de inflexión, por debajo del cual no se detecta una respuesta significativa. Cuando la densidad óptica supera los  $DO_{600}$  de 3,0 nm tras un periodo prolongado, las células alcanzan la fase estacionaria, mostrando pérdida de viabilidad, lo que afectaría indirectamente la expresión de GFP.

El aumento de fluorescencia indica que el gen YLR346C responde al estrés inducido por el pirimetanil, activando la expresión de GFP. Este comportamiento sugiere que el

promotor del gen está involucrado en mecanismos de defensa celular. La baja fluorescencia inicial refleja una fase de ajuste celular, mientras que el incremento posterior se alinea con la activación de mecanismos específicos en respuesta al estrés.

Los resultados confirman la hipótesis donde se plantea que la exposición al pirimetanil activa el promotor YLR346C, incrementando la expresión del gen reportero GFP. La concentración del pesticida y el tiempo de exposición son factores determinantes en esta respuesta.

(Gil et al., 2014) indican que, en condiciones de estrés, las células de levadura disminuyen la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas, el ciclo celular y la degradación del ARN, priorizando la supervivencia. Estos hallazgos coinciden con la observación en este estudio de baja fluorescencia inicial atribuida a un ajuste metabólico. (Mendes et al., 2024) reportan que bajas concentraciones de pesticida no afectan significativamente el crecimiento de *S. cerevisiae*, mientras que altas concentraciones y tiempos prolongados provocan la pérdida de integridad de la membrana plasmática y reducción de la tasa de crecimiento. Esto respalda los resultados sobre el efecto del pesticida en la viabilidad celular y su influencia en la expresión del GFP.

Adicionalmente, algunos estudios destacan la influencia del estado fisiológico de las levaduras en la expresión de genes reporteros. En el estudio de (Laxman et al., 2010) señalan que las levaduras en fase estacionaria activan genes relacionados con la supervivencia y el control de calidad proteica, respuestas que se reducen con el tiempo al entrar en un estado de inactividad. Esto podría explicar por qué la activación de la expresión de gen YLR346C, observada a través del gen reportero GFP, depende no solo de la concentración de pesticida, sino también del tiempo de exposición y del estado metabólico de las células.

Por otro lado, (Garay et al., 2014) destacan que, durante la fase estacionaria, los genes relacionados con la resistencia al estrés contribuyen a la longevidad de las levaduras. Evaluaron la supervivencia en fase estacionaria de poblaciones de levaduras y descubrieron que el 14 % de las cepas mutantes viables mostraron alteraciones en su capacidad de supervivencia durante esta fase, recalando la importancia de los mecanismos de respuesta al estrés en la adaptación celular. Estos resultados apoyan la idea de que la expresión de GFP en este estudio podría estar mediada por vías específicas activadas bajo condiciones de estrés prolongado.

Finalmente, el análisis que realizan (Nussbaum et al., 2014) dice que, durante la transición de las levaduras hacia la fase estacionaria, su capacidad para responder al estrés oxidativo disminuye, lo que podría influir en la eficiencia de los reporteros fluorescentes bajo condiciones de estrés prolongado. Esto complementa la interpretación de los resultados, ya que el estado de las levaduras y el tiempo de exposición son factores importantes para la activación del promotor YLR346C y la expresión de GFP.

Estos resultados resaltan la importancia de considerar diversas variables experimentales en el diseño de biosensores basados en expresión génica para mejorar la precisión en la detección de pesticidas.

### **Conclusión**

Se logró evaluar la expresión del promotor YLR346C en *S. cerevisiae* frente al pesticida pirimetanil. Los resultados muestran que tanto la concentración del pesticida como el tiempo de exposición influyen en la activación del promotor. La fluorescencia de GFP refleja la respuesta al estrés celular inducido por el pesticida, apoyando la hipótesis planteada.

El aumento de fluorescencia con mayor concentración de pesticida sugiere que el promotor YLR346C podría ser útil para monitorear pesticidas en zonas agrícolas. Además, la interacción entre concentración y tiempo destaca la importancia de considerar el estado fisiológico de las células en el diseño de biosensores basados en expresión génica.

Aun que los resultados son bastante satisfactorios, es necesario realizar más estudios para validar la efectividad de los biosensores en condiciones que imiten mejor los factores reales que se encuentran en las zonas agrícolas. Futuros trabajos deberían optimizar las condiciones experimentales, mejorar la estabilidad del biosensor y ampliar la capacidad de detección de otros pesticidas.

Este estudio abre nuevas posibilidades para el uso de levaduras como biosensores sostenibles en el monitoreo de pesticidas, contribuyendo al desarrollo de herramientas biotecnológicas más precisas y eficientes para la detección de contaminantes en la agricultura.

## Bibliografía

- Anton, B. P., & Raleigh, E. A. (2016). Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha, a Derivative of Escherichia coli K-12 DH5 $\alpha$ . *Genome Announcements*, 4(6), 1245–1261. <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01245-16>
- BIO RAD. (2024). *Gene Pulser Xcell™ Electroporation System Instruction Manual* (p. 83). discover.bio-rad.com
- BY4742 / SGD. (n.d.). Retrieved September 4, 2024, from <https://www.yeastgenome.org/strain/by4742>
- Casali, N., & Preston, A. (2003). E. coli Plasmid Vectors. *E. Coli Plasmid Vectors*. <https://doi.org/10.1385/1592594093>
- Chen, R., Liu, T., Deng, D., Huang, L., Min, M., & Xiao, X. (2024). Review: Progress towards research on the toxicology of pyrimethanil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 283, 109940. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2024.109940>
- Euroscarf - BY4742. (n.d.). Retrieved September 29, 2024, from <http://www.euroscarf.de/search.php?search=BY4742&project=&selectedProject=>
- EPD - YLR346C\_1 viewer. (n.d.). Retrieved September 25, 2024, from [https://epd.expasy.org/cgi-bin/epd/get\\_doc?db=scEpdNew&format=genome&entry=YLR346C\\_1](https://epd.expasy.org/cgi-bin/epd/get_doc?db=scEpdNew&format=genome&entry=YLR346C_1)
- FAO. (2022). Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators - Global, regional and country trends, 1990-2020. In *FAOSTAT* (Vol. 46). FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0918en>
- FAO-WHO. (2024). *CODEXALIMENTARIUS*. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/es/>
- Garay, E., Campos, S. E., González de la Cruz, J., Gaspar, A. P., Jinich, A., & DeLuna, A. (2014). High-Resolution Profiling of Stationary-Phase Survival Reveals Yeast Longevity Factors and Their Genetic Interactions. *PLOS Genetics*, 10(2), e1004168. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004168>

- Gil, F. N., Becker, J. D., & Viegas, C. A. (2014). Potential Mechanisms Underlying Response to Effects of the Fungicide Pyrimethanil from Gene Expression Profiling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(23), 5237–5247. <https://doi.org/10.1021/jf5007775>
- Hahne, K., Rödel, G., & Ostermann, K. (2021). A fluorescence-based yeast sensor for monitoring acetic acid. *Engineering in Life Sciences*, 21(5), 303–313. <https://doi.org/10.1002/ELSC.202000006>
- Jarque, S., Bittner, M., Blaha, L., & Hilscherova, K. (2016). Yeast Biosensors for Detection of Environmental Pollutants: Current State and Limitations. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 34, Issue 5, pp. 408–419). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.01.007>
- Kalyani, N., Goel, S., & Jaiswal, S. (2021). On-site sensing of pesticides using point-of-care biosensors: a review. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 19, Issue 1, pp. 345–354). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01070-1>
- Kumaran, A., Vashishth, R., Singh, S., U, S., James, A., & Velayudhaperumal Chellam, P. (2022). Biosensors for detection of organophosphate pesticides: Current technologies and future directives. *Microchemical Journal*, 178, 107420. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2022.107420>
- Laxman, S., Sutter, B. M., & Tu, B. P. (2010). Behavior of a metabolic cycling population at the single cell level as visualized by fluorescent gene expression reporters. *PLoS ONE*, 5(9), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012595>
- Lee, G. H., & Choi, K. C. (2020). Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 235, 108789. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2020.108789>
- Mark, M., & Salzburg, R. (2022). *Targeted evaluation of the effect of an assortment of Saccharomyces cerevisiae proteins on the protein shuttling of Ola1 to and from mitochondria and lipid droplets during heat stress.*
- Mendes, F., Miranda, E., Amaral, L., Carvalho, C., Castro, B. B., Sousa, M. J., & Chaves, S. R. (2024). Novel yeast-based biosensor for environmental monitoring of

tebuconazole. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.1007/S00253-023-12944-Z/FIGURES/6>

Ministerio de Salud Pública. (2024). *Intoxicación por plaguicidas*.

Niedenthal, R. K., Riles?, L., Johnston, M., & Hegemann, J. H. (1996). *Yeast Functional Analysis Reports Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression and Subcellular Localization in Budding Yeast* (Vol. 12).

Nussbaum, I., Weindling, E., Jubran, R., Cohen, A., & Bar-Nun, S. (2014). Deteriorated Stress Response in Stationary-Phase Yeast: Sir2 and Yap1 Are Essential for Hsf1 Activation by Heat Shock and Oxidative Stress, Respectively. *PLOS ONE*, 9(10), e111505. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0111505>

PortalTecnológico. (2024). *Pirimetanol*.  
<https://www.buscador.portaltecnologico.com/vademecum/mex/producto-tecnico/8525/PIRIMETANIL>

Ragon, M., Bertheau, L., Dumont, J., Bellanger, T., Grosselin, M., Basu, M., Pourcelot, E., Horrigue, W., Denimal, E., Marin, A., Vaucher, B., Berland, A., Lepoivre, C., Dupont, S., Beney, L., Davey, H., & Guyot, S. (2023). The Yin-Yang of the Green Fluorescent Protein: Impact on *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 238, 112603. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2022.112603>

Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., Srivastav, A. L., & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 283, 124657. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.124657>

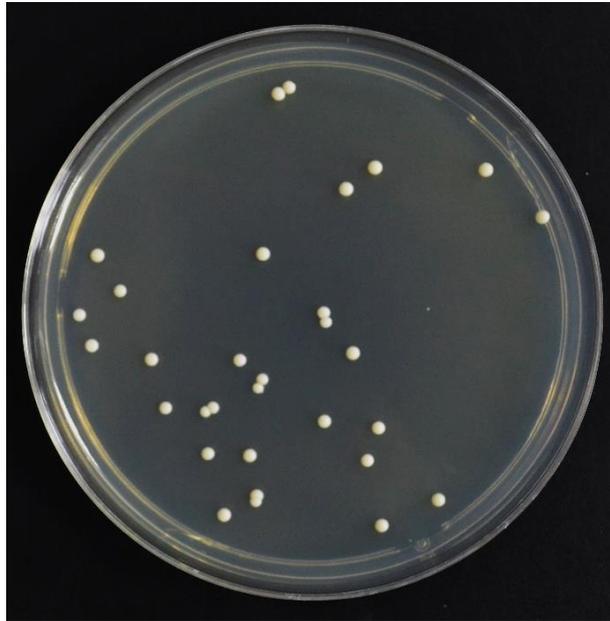
Rossio, V., Liu, X., & Paulo, J. A. (2023). Comparative Proteomic Analysis of Two Commonly Used Laboratory Yeast Strains: W303 and BY4742. *Proteomes*, 11(4), 30. <https://doi.org/10.3390/PROTEOMES11040030/S1>

Saccharomyces Genome Database. (2024). *BY4742*.  
<https://www.yeastgenome.org/strain/by4742>

Sambrook, J., & Green, M. (2012). *Molecular Cloning This is a free sample of content from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition*. [www.cshlpress.org](http://www.cshlpress.org)

- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, 350, 3–41.  
[http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman\\_f/StartedYeast.html](http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/StartedYeast.html)
- Supchocksoonthorn, P., Hanchaina, R., Sinoy, M. C. A., de Luna, M. D. G., Kangsamaksin, T., & Paoprasert, P. (2021). Novel solution- and paper-based sensors based on label-free fluorescent carbon dots for the selective detection of pyrimethanil. *Applied Surface Science*, 564, 150372.  
<https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2021.150372>
- Thermo Scientific. (2024). *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (p. 11).  
[www.thermoscientific.com/onebio](http://www.thermoscientific.com/onebio)
- Verma, N., & Bhardwaj, A. (2015). Biosensor Technology for Pesticides—A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 3093–3119.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1489-2>
- Wahid, E., Ocheja, O. B., Marsili, E., Guaragnella, C., & Guaragnella, N. (2023). Biological and technical challenges for implementation of yeast-based biosensors. In *Microbial Biotechnology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 54–66). John Wiley and Sons Ltd.  
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.14183>
- WHO. (2024). *Pesticide residues in food*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>

## Anexos



Fotografía de levaduras BY4742 con pUG35 – YLR346C. Crecimiento en medio YNB – Glucosa con Histidina, leucina y lisina.



Fotografía de levaduras BY4742 con pUG34. Control positivo de fluorescencia, crecimiento en medio YNB – Glucosa con leucina, lisina y uracilo.



Fotografía de levaduras BY4742, Wild Type. Control negativo, crecimiento en medio YNB – Glucosa con Histidina, leucina, lisina y uracilo.