



UNIVERSIDAD DE INVESTIGACIÓN DE TECNOLOGÍA EXPERIMENTAL YACHAY

Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *STR3* DE *Saccharomyces cerevisiae* EN
PRESENCIA DE PESTICIDAS COMÚNMENTE USADOS EN ECUADOR**

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

Autor:

Paulo César Robles Ruíz

Tutor:

Fernando Alexis Gonzales Zubiato, PhD.

Urcuqui, diciembre 2024

AUTORÍA

Yo, **Paulo César Robles Ruíz**, con cédula de identidad 0401233788, declaro que las ideas, juicios, valoraciones, interpretaciones, consultas bibliográficas, definiciones y conceptualizaciones expuestas en el presente trabajo; así como, 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, octubre, 2024

Paulo César Robles Ruíz

0401233788

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Paulo César Robles Ruíz**, con cédula de identidad 0401233788, 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 Urcuquí, octubre, 2024

Paulo César Robles Ruíz

0401233788

Dedicatoria

Con gran admiración y gratitud dedico este trabajo de investigación a Nelly y Gladys Ruíz, quienes incondicionalmente han iluminado cada momento de mi vida, me mostraron la valentía en sus ojos y me enseñaron la libertad de los sueños.

Agradecimiento

A mis profesores de maestría en especial a Javier Álvarez, PhD y Lenin Ramírez, PhD por su apoyo y consejos.

Al profesor Fernando Alexis Gonzales, PhD, tutor del presente trabajo.

Al personal técnico de los laboratorios de Biología de la Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería por su gran disposición y paciencia.

Resumen

La industria agrícola moderna enfrenta un dilema importante, pues la población mundial aumenta drásticamente y con ello se intensifica el uso de pesticidas para mantener la producción. Los fungicidas han demostrado relativa eficacia para controlar determinadas plagas y enfermedades en los cultivos, pero debido a su baja especificidad también han sido relacionados con afectaciones en diversos ecosistemas, destacando la necesidad del desarrollo de nuevas herramientas de monitoreo. El presente proyecto tiene como objetivo el desarrollo inicial de un biosensor basado en la modificación de *Saccharomyces cerevisiae* para la detección y cuantificación de pirimetanil, fungicida de uso común en la agricultura ecuatoriana. Con este fin, se clonó el promotor del gen *STR3* fusionado al gen reportero GFP y se expresó en cepas de *S. cerevisiae* en presencia del pesticida pirimetanil. Los resultados muestran que las concentraciones más altas del fungicida afectan significativamente el crecimiento de la levadura, destacando un efecto nocivo. Los análisis de fluorescencia revelaron que el sistema de expresión GFP respondió al estrés inducido, relacionando la intensidad de fluorescencia a las concentraciones más altas (20 y 110mg/L) y siendo diferenciada de los controles negativos en cada tratamiento experimental. El intervalo de tiempo de 4 horas fue el más sensible registrando la intensidad más alta. La respuesta celular de fluorescencia sugiere que el promotor *STR3* es relevante para la construcción del biosensor propuesto, reiterando su potencial como herramienta para la detección y monitoreo del pirimetanil y otros pesticidas.

Palabras claves: Fungicida, toxicidad, biosensores, pirimetanil

Abstract

The modern agricultural industry faces an important dilemma as the global population is rapidly increasing. Consequently, the use of pesticides has intensified to maintain crop production. Fungicides have proven relatively effective in controlling certain pests and diseases in crops; however, due to their low specificity, they have been linked to adverse effects on various ecosystems. This highlights the need for new monitoring tools. The aim of this project is to develop an initial biosensor based on the modification of *Saccharomyces cerevisiae* for the detection and quantification of pyrimethanil, a fungicide commonly used in Ecuadorian agriculture. To achieve this, the promoter of the *STR3* gene was cloned and fused to the GFP reporter gene, which was expressed in *S. cerevisiae* strains exposed to pyrimethanil. The results show that higher concentrations of the fungicide significantly affected yeast growth, indicating a toxic effect. Fluorescence analysis revealed that the GFP expression system responded to induced stress, with fluorescence intensity correlating to higher concentrations (20 and 110 mg/L), differentiating it from negative controls in each experimental treatment. The 4-hour time interval was the most sensitive, recording the highest intensity. The fluorescence response suggests that the *STR3* promoter is relevant for constructing the proposed biosensor, reinforcing its potential as a tool for detecting and monitoring pyrimethanil and other pesticides.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
2	FUNGICIDAS	3
2.1	Pirimetamil	4
2.1.1	Mecanismo de acción y efectos del pirimetamil.	4
2.1.2	Impacto de la deficiencia de metionina en la fisiología y metabolismo.	5
2.1.3	Toxicidad y contaminación ambiental del pirimetamil.	6
2.1.4	Persistencia, toxicidad y degradación ambiental.....	7
2.1.5	Efecto en líneas celulares y humanos.....	8
2.1.6	Respuesta transcripcional al pirimetamil	9
3	GEN REGULADOR TRANSCRIPCIONAL DE AZUFRE	9
3.1	Estructura genética	9
3.2	Función y regulación transcripcional	10
3.3	Implicaciones de la disfunción del <i>STR3</i>	12
4	<i>S. cerevisiae</i> COMO MODELO DE ESTUDIO DE TOXICIDAD DE PESTICIDAS	12
4.1	<i>S. cerevisiae</i> como modelo de estudio de toxicidad del pirimetamil	15
4.2	Aplicación de <i>S. cerevisiae</i> en biología sintética y desarrollo de biosensores	16
4.2.1	Biosensor: Estructura y clasificación	16
4.2.2	YBB Dependientes de la transcripción	18
4.2.3	YBB Independientes de la transcripción	20
4.3	Desarrollo de biosensores mediante <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
5	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	24
6	OBJETIVOS	25
7	METODOLOGÍA	26
7.1	Amplificación de la región promotora <i>STR3</i>	26
7.2	Cepas y Plásmidos	27
7.2.1	<i>Escherichia coli</i>	27
7.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
7.2.3	Vector plasmídico pUG35	27
7.2.4	Vector plasmídico pUG34 (control positivo)	28
7.3	Enzimas de restricción	29
7.4	Formulaciones y medios de cultivo	30
7.5	Modificación del vector e inserción del promotor <i>STR3</i>	32
7.6	Transformación	33

7.6.1 Extracción y purificación del ADN plasmídico	33
7.6.2 Preparación de células electro competentes.....	33
7.6.3 Electroporación	34
7.7 Evaluación del efecto del PYR en el crecimiento y expresión de GFP.....	34
7.7.1 Preparación de cultivos y controles.....	35
7.7.2 Exposición a pirimetanil (Curvas de crecimiento).....	35
7.7.3 Exposición a pirimetanil (Intensidad de fluorescencia)	36
7.7.4 Expresión de GFP bajo control del promotor <i>STR3</i> en respuesta a Pirimetanil..	36
7.8 Análisis de microscopía de fluorescencia	37
7.9 Cuantificación automática de fluorescencia	37
8 RESULTADOS.....	38
8.1 Clonación	38
8.1.1 Amplificación de la secuencia promotora <i>STR3</i>	38
8.1.2 Modificación del vector pUG35.....	38
8.2 Análisis y validación del constructo pUG35 modificado (pUG35-PSTR3).....	40
8.2.1 Confirmación de la integridad mediante secuenciación y digestión enzimática.	40
8.3 Transformación	43
8.4 Curvas de crecimiento	45
8.4.1 Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> BY4742 "Wild type"	46
8.4.2 Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> BY 4742 modificada con el vector 35- pSTR3.....	48
8.5 Número de Células y Porcentaje de fluorescencia	49
8.6 Evaluación de la Intensidad de fluorescencia de GFP.....	50
8.7 Registros fotográficos de fluorescencia	54
8.7.1 Concentración de pirimetanil a 0 mg/L y 5mg/L	54
8.7.2 Concentración de pirimetanil a 10 mg/L y 15mg/L	55
8.7.3 Concentración de pirimetanil a 20 mg/L y 110mg/L	56
9 DISCUSIÓN.....	58
9.1 Análisis y validación del constructo pUG35 modificado	58
9.2 Curvas de crecimiento	59
9.2.1 Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> BY4742 "Wild type"	59
9.2.2 Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> BY 4742 modificada con el vector 35- PSTR3.	60
9.3 Número de Células y Porcentaje de fluorescencia	60
9.4 Evaluación de la Intensidad de fluorescencia GFP.....	61
9.5 Respuesta fluorescente a concentraciones incrementales de PYR	62

9 CONCLUSIONES	65
10 REFERENCIAS	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efectos inhibitorios y cambios en la expresión génica inducidos por diferentes pesticidas en <i>S. cerevisiae</i>	14
Tabla 2. Efectos del fungicida pirimetanil en <i>S. cerevisiae</i> : Cambios en la expresión génica, metabolismo y respuesta al estrés.....	16
Tabla 3. Aplicación de biosensores basados en <i>S. cerevisiae</i> para la detección de compuestos relacionados a estudios ambientales.	22
Tabla 4. Aplicación de biosensores basados en <i>S. cerevisiae</i> en diversas aplicaciones biomédicas y biológicas.	23
Tabla 5. Plásmidos y cepas usados en el estudio.....	29
Tabla 6. Composición medio mínimo de levadura con bases nitrogenadas (YNB) y dextrosa. (Sherman, 2002).....	30
Tabla 7. Concentraciones de aminoácidos(Sherman, 2002).....	31
Tabla 8. Composición del medio rico YPD (Extracto de levadura, peptona, dextrosa) (Sherman, 2002)	31
Tabla 9. Composición del medio LB.....	31
Tabla 10. Reactivos para células electrocompetentes de <i>E. coli DH5α</i>	31
Tabla 11. Reactivos para células electrocompetentes de levaduras.....	32
Tabla 12. Tratamientos experimentales para la evaluación de intensidad de fluorescencia	36
Tabla 13. Promedio de células observadas en cinco campos 40x bajo cada condición experimental... ..	50
Tabla 14. Intensidad de fluorescencia en respuesta a tratamientos de pirimetanil	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del pirimetanil en dos dimensiones y tres dimensiones. (Mol-Instincts 2023).	4
Figura 2. Mecanismo de acción bioquímico del pirimetanil sobre la actividad de la enzima cistationina. Adaptado de (Verma & Gupta, 2021).....	5
Figura 3. Localización cromosómica del gen STR3. Adaptada de (<i>Saccharomyces</i> Genome Database, 2024).....	10
Figura 4. Asimilación de azufre y biosíntesis de metionina, cisteína y glutatión en <i>S. cerevisiae</i> . Adaptado de (Song et al., 2020)	11
Figura 5. Componentes de un biosensor. Adaptado de (Hassani et al., 2017).....	17
Figura 6. Esquema de reconocimiento del ligando de interés en un biosensor de levadura dependiente de Transcripción. Adaptado de (Adeniran et al., 2015).....	18
Figura 7. Mapa vectorial de plásmido pUG35. Adaptado de NovoPro Labs (2024).	28
Figura 8. Mapa vectorial de plásmido pUG34. Adaptado de NovoPro Labs (2024).	29
Figura 9. Mapa vectorial de plásmido pUG35 detallando ubicación del promotor MET. Adaptado de NovoPro Labs (2024).	32
Figura 10. Secuencia promotora del gen STR3 y detalle de sitios de restricción	33
Figura 11. Gel de agarosa 1 %. Amplicón de secuencia promotora STR3.....	38
Figura 12. Gel de agarosa 1 %. Vector pUG35, fragmentado.	39
Figura 13. Detalle de la sección promotora STR3-GFP insertada en el vector pUG35	40
Figura 14. Gel de agarosa 1 %. Verificación de vectores mediante corte enzimático	41
Figura 15. Representación gráfica del promotor <i>STR3</i> de <i>S. Cerevisiae</i> y detalle del navegador genómico UCSC (Eukaryotic Promoter Database.2023).	43
Figura 16.Crecimiento de colonias transformadas BY4742 con PUG35-PSTR3 en medio YNB-Glucosa /Histidina/Leucina/Lisina	44
Figura 17. Crecimiento de colonias transformadas de BY 4742 con pUG34 (Control positivo de fluorescencia) en medio YNB-Glucosa /Leucina/Lisina/Uracilo	44
Figura 18. Crecimiento de colonias de <i>S. cerevisiae</i> BY4742 en medio YNB Glucosa /Histidina/Leucina/Lisina/Uracilo	45
Figura 19. Curvas de crecimiento de BY4742 “Wild Type” expuesta a cuatro concentraciones de pirimetanil.	46
Figura 20. Curva de crecimiento de BY4742/PSTR3-GFP.	48
Figura 21. Respuesta fluorescente de <i>S. cerevisiae</i> STR3-GFP a concentraciones incrementales de pirimetanil.....	53
Figura 22. Registro fotográfico a concentraciones de 0 y 5mg/L	55
Figura 23. Registro fotográfico a concentraciones de 10 y 15mg/L	56
Figura 24. Registro fotográfico a concentraciones de 20 y 110g/L	57

1 INTRODUCCIÓN

Los pesticidas han desempeñado un papel crucial en la reducción de enfermedades e incremento de la producción agrícola, contribuyendo significativamente al crecimiento poblacional mundial en el siglo XX (Tudi et al., 2021). No obstante, la dependencia desarrollada por nuestras sociedades a estos compuestos representa uno de los desafíos más críticos de sostenibilidad ambiental y salud pública, que no se limita al ámbito tecnológico, sino que involucra factores socioeconómicos y políticos de escala mundial (Hu, 2020). La finalidad de un pesticida de acción antifúngica es prevenir, eliminar o controlar el crecimiento de hongos y mohos, sin embargo, se han descrito una serie de problemas relacionados a su especificidad que contribuyen significativamente a la ecotoxicidad ambiental, eutrofización y toxicidad humana (Tsalidis, 2022)

En Ecuador para el 2023, la superficie de uso agropecuario con cultivos permanentes y transitorios supera los dos millones de hectáreas, presentando un incremento notable en el uso de fertilizantes y pesticidas (INEC, 2024). Entre 2000 y 2018 en nuestro país, el uso de fertilizantes se duplicó, señalando el aumento paralelo en el uso de pesticidas para mantener el rendimiento agrícola y a nivel mundial solo en el 2022, el uso de pesticidas fue de aproximadamente 3,7 millones de toneladas de ingredientes activos, lo que representa un aumento del 4% respecto a años anteriores (FAO, 2024). Este incremento ha generado temas de preocupación en la salud pública, reportándose exclusivamente para lo que va del año 235 casos de intoxicación por plaguicidas (52.34 % relacionados a herbicidas y funguicidas) (MSP del Ecuador, 2024). En el desarrollo agroeconómico nacional el uso de fungicidas ha tenido gran impacto, especialmente en cultivos de destacable importancia económica como el banano y rosas. Entre los fungicidas más empleados está el pirimetanil, fungicida anilino-pirimidínico de amplio espectro (Eberlin & Frampton, 2017) empleado principalmente para el control del moho gris de frutas y flores, productos predominantes en la exportación ecuatoriana. Su aplicación excesiva o inadecuada plantea serias preocupaciones de carácter ambiental, resaltando la importancia de la implementación de mecanismos que permitan regular la concentración a ser aplicada y establezcan límites máximos de residuos, con el fin de promover y garantizar prácticas agrícolas sostenibles.

En este contexto, resaltan los biosensores como herramientas cruciales para la detección y el monitoreo de varias clases de pesticidas, Estos dispositivos aprovechan células o elementos celulares en el reconocimiento de moléculas; ofrecen ventajas significativas,

como su fácil manipulación, alta sensibilidad, amplio rango de linealidad y costo-beneficio favorable (Kalyani et al., 2021).

Mediante la Biología Sintética se ha implementado el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para mejorar la adaptabilidad y sensibilidad de biosensores en distintas áreas de investigación.

Dado que el pirimetanil está asociado con diversas alteraciones metabólicas incluyendo la biosíntesis de metionina (Y. Zhang et al., 2021) su presencia y quizá concentración podría ser detectada mediante la expresión de una secuencia promotora también relacionada a esta vía metabólica. Estudios previos sobre perfiles transcripcionales en respuesta a la exposición a Pirimetanil han identificado un conjunto de genes con actividad aumentada, entre ellos el gen *STR3*. Este gen codifica la enzima cistationina beta-liasa, que cataliza la conversión de cistationina en homocisteína, un paso clave en la vía de transulfuración y que conecta el metabolismo de la metionina y la cisteína (Gil et al., 2014).

El presente estudio se centra en la modificación de *S. cerevisiae* cepa BY4742 mediante técnicas de biología molecular para la expresión de una proteína fluorescente en respuesta a la presencia del fungicida. Con este enfoque, se pretende establecer un punto de partida para el desarrollo de un biosensor de monitoreo ambiental de pesticidas antifúngicos comúnmente utilizados en Ecuador.

2 FUNGICIDAS

Los fungicidas desarrollados principalmente en el contexto agroindustrial, constituyen un tipo de pesticida específicamente formulados para el control o eliminación de hongos (Tsalidis, 2022), ayudando en la prevención de enfermedades y protección de cultivos. Estos productos actúan en varias fases del ciclo de vida de los hongos, principalmente en la germinación de esporas, el crecimiento del micelio y la esporulación (Umetsu & Shirai, 2020). A partir de 2010, los fungicidas fueron denominados con nombres comunes por la ISO y su clasificación se basa en su composición química, mecanismo de acción u organismo a controlar, pero en general se clasifican como protectores y sistémicos (Baibakova et al., 2019).

Los fungicidas protectores, también llamados de contacto, se aplican de forma superficial. Su mecanismo de acción consiste en formar una barrera física que impide la penetración de los patógenos y su eficacia depende de una cobertura uniforme y constante, la cual debe renovarse periódicamente, especialmente tras la ocurrencia de lluvias o durante el desarrollo de nuevo follaje (Sayuk et al., 2022).

Los fungicidas sistémicos son absorbidos y distribuidos internamente a través del sistema vascular de las plantas, actúan a nivel celular y pueden tratar infecciones más profundas y específicas, siendo eficaces tanto en la curación como en la prevención. Sin embargo, existe un mayor peligro de que los hongos desarrollen resistencia debido a que su acción se centra en una etapa específica del desarrollo (Ayesha et al., 2021).

Entre los fungicidas de mayor uso a nivel mundial destacan:

Mancozeb: Fungicida de contacto, perteneciente al grupo de los ditiocarbamatos. Inhibe actividad enzimática mediante la interferencia con el metabolismo de los ácidos grasos.

Clorotalonil: De amplio espectro, perteneciente al grupo de los cloronitrilos. Interviene como inhibidor no específico de la respiración celular.

Azoxistrobina: Fungicida sistémico, perteneciente al grupo de las estrobilurinas. Inhibe la cadena de transporte de electrones en los complejos mitocondriales.

Captan: De contacto, perteneciente al grupo de las ftalimidas. Reacciona con los grupos sulfhidrilos inhibiendo la función enzimática.

Pirimetanil: Fungicida sistémico, perteneciente al grupo de las anilinas. Actúa como inhibidor de la síntesis de metionina.

2.1 Pirimetanil

El Pirimetanil (PYR) es un fungicida anilino-pirimidínico de amplio espectro descubierto en 1987 por Buhmann y colaboradores (Eberlin & Frampton, 2017), desarrollado por la farmacéutica alemana Schering AG a inicios de los noventa (Cabras et al., 1997) y aprobado en 1998 para su uso en varios países de la Unión Europea y Estados Unidos (Epa & of Pesticide Programs, 2004). El objetivo inicial de este fungicida foliar fue el controlar el moho gris (*Botrytis cinerea*) en uvas, frutas y verduras y por su eficacia comprobada y su perfil de seguridad es ampliamente empleado en la agroindustria bajo una gran diversidad de nombres y marcas (Rosslenbroich et al., 2000) (W. Shao et al., 2021)

El compuesto 4,6-dimetil-N-fenilpirimidin-2-amina $C_{12}H_{13}N_3$ o pirimetanil (Figura 1) posee una variedad de actividades biológicas, y sus derivados destacan por sus propiedades antibacterianas, y antifúngicas (Maddila et al., 2016).

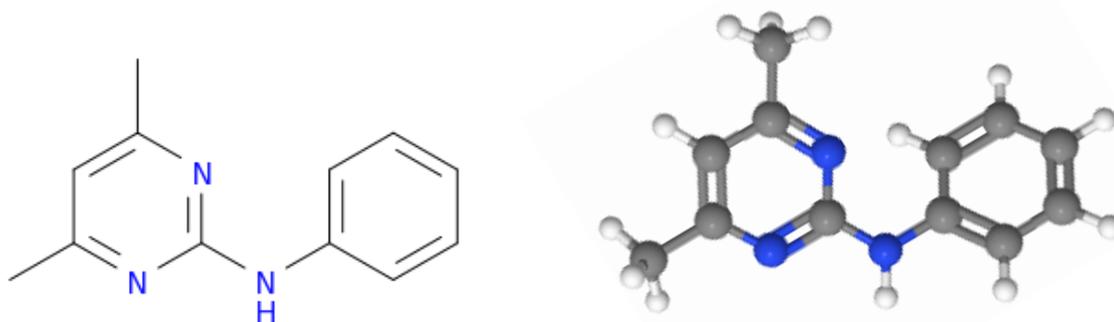


Figura 1. Estructura química del pirimetanil en dos dimensiones (izquierda) y en tres dimensiones (derecha). Los átomos se representan según el esquema de colores CPK: gris para carbono, blanco hidrógeno y azul nitrógeno. (Mol-Instincts 2023).

2.1.1 Mecanismo de acción y efectos del pirimetanil.

La diversidad de aplicaciones agroindustriales de este compuesto debe tomarse en cuenta por sus características químicas y particular modo de acción. Mientras que otros fungicidas han demostrado inhibición de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (Kuplińska

& Rząd, 2021), el pirimetanil demuestra disminución, aumento e incluso actividad reversible en la cantidad total de aminoácidos libres extraídos del micelio de diversas especies fúngicas (Ren et al., 2017) (Xu et al., 2018). La acumulación de cistationina y la disminución de metionina sugiere una relación directa con la inhibición de la cistationina β -liasa, constituyendo este el principal efecto de exposición en determinados hongos (Y. Zhang et al., 2021).

La cistationina β -liasa es una enzima clave en la vía de transulfuración que toma lugar con la homoserina, catalizando la conversión de cistationina en homocisteína, amoníaco y piruvato, un paso esencial en la biosíntesis de metionina (Figura 2), un aminoácido esencial para el crecimiento y metabolismo (Verma & Gupta, 2021)

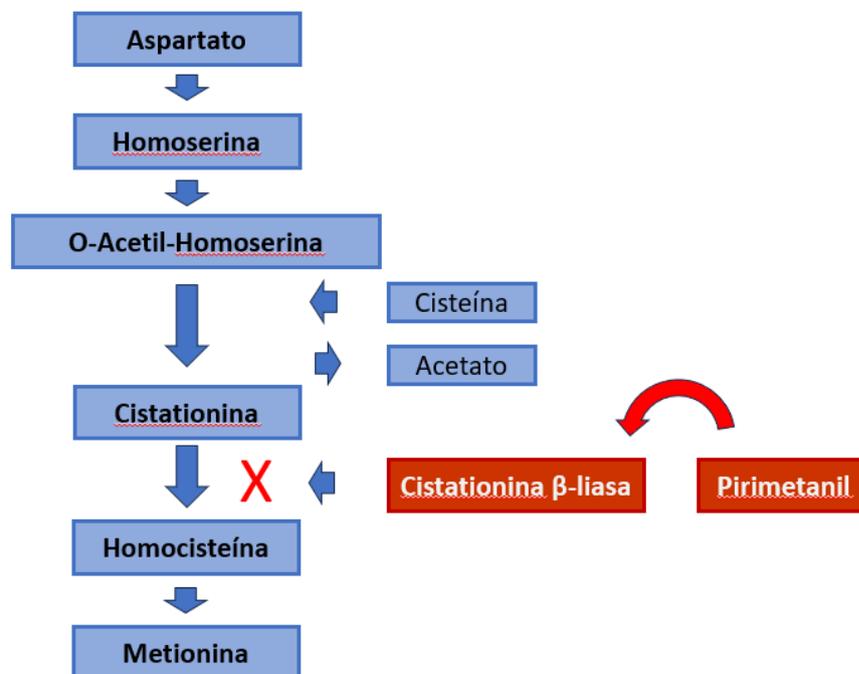


Figura 2. Mecanismo de acción bioquímico de los compuestos Anilino-pirimidínicos (Pirimetanil) sobre la actividad de la enzima cistationina. Adaptado de (Verma & Gupta, 2021)

2.1.2 Impacto de la deficiencia de metionina en la fisiología y metabolismo.

En los hongos, la deficiencia de metionina puede desencadenar diversas respuestas fisiológicas y bioquímicas que podrían impactar de forma drástica en su adaptación, crecimiento, metabolismo incluso virulencia (Scott et al., 2020). En organismos modelo como *S. cerevisiae* y *Candida albicans*, al reducirse los niveles de metionina, se produce

una respuesta de regulación transcripcional que modifica la expresión génica relacionada con su transporte y biosíntesis, por ejemplo: Met4 y Cbf1., se activan ante la escasez de metionina, lo que conduce a alteraciones en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos azufrados esenciales en la viabilidad celular (Johnson et al., 2021) (Shrivastava et al., 2021)

Otro punto a considerar es que la producción de poliaminas, como la espermidina y la espermina, que es afectada por la disminución de este aminoácido esencial; estas poliaminas son claves para la estabilización estructural, síntesis proteica, la protección contra el estrés oxidativo, regulación del crecimiento y la diferenciación celular (Masson et al., 2017). La S-adenosilmetionina (SAM) es el precursor de estas poliaminas; por lo tanto, la disponibilidad de SAM disminuye con la reducción de metionina; esto puede tener un impacto negativo en la síntesis de proteínas y la replicación del ADN (Hayashi et al., 2018).

Otro efecto en el que se destaca la importancia de la metionina y la SAM en el metabolismo celular se relaciona con la vías de señalización de la rapamicina (TOR) en sus dos complejos principales mTORC1-2 y la activación de la proteína quinasa mediante AMP (AMPK) (X. Gu et al., 2017), provocando una disminución en la síntesis de proteínas e incrementando su degradación a causa de los altos niveles de aminoácidos libres y alteraciones en lípidos. Todo esto conlleva a alteraciones del ciclo de ácido tricarboxílico (TCA) y la fosforilación oxidativa incrementando el gasto energético celular (Kalhan et al., 2011)(Hayakawa et al., 2015)

2.1.3 Toxicidad y contaminación ambiental del pirimetanil.

El pirimetanil es considerado como un contaminante ambiental de efectos tóxicos persistentes en una gran diversidad de organismos (Y. Wang et al., 2018) por lo que las posibles afectaciones en la salud humana generan inquietud (Faniband et al., 2019a), ha sido detectado en múltiples ecosistemas terrestres y acuáticos, y a pesar de un uso extensivo no está descrito a detalle el alcance de su ecotoxicidad (Müller et al., 2019a), por lo que es necesario abordar ciertos puntos en cuanto al tema.

2.1.4 Persistencia, toxicidad y degradación ambiental

Debido a su amplio uso y eficacia como controlador fúngico en la agroindustria el pirimetanil es bien reconocido. Sin embargo, su persistencia en el medio ambiente y los efectos adversos sobre diversos ecosistemas generan una preocupación considerable (Chen et al., 2023), siendo relacionada con efectos tóxicos en organismos como bacterias (Lloyd et al., 2023), artrópodos (Eastabrook et al., 2022), anfibios (Bernabò et al., 2017), peces (Meng et al., 2020a), microalgas (Shinn et al., 2015a), mamíferos (Seeland et al., 2012) incluso líneas celulares humanas (Aleksić et al., 2019a).

Agua

Los ambientes acuáticos son unos de los más afectados principalmente por su persistencia y movilidad (Müller et al., 2019b), en aguas superficiales cercanas a áreas agrícolas se han detectado concentraciones en entre 0,06 y 90 µg/L (Herrero-Hernández et al., 2016), y dado su baja volatilidad se prolonga su presencia especialmente en sistemas de sedimentación, donde dependiendo de la temperatura puede tardar hasta 80 días en degradarse (Shinn et al., 2015b).

Ha demostrado tener impactos negativos en la alimentación, reproducción y supervivencia de una gran variedad de organismos acuáticos (Araújo et al., 2015) (Meng et al., 2020b), provocando la migración de comunidades a zonas menos afectadas e impidiendo el desarrollo de macroalgas y macrófitas esenciales para estos ecosistemas (Müller et al., 2019c).

Suelo

En el suelo, la toxicidad y efectos de este fungicida también dependen de su persistencia y degradación, la cual es principalmente biótica e influenciada por la actividad microbiana, luz, oxígeno, temperatura y tipo de suelo (Vanni et al., 2006). Estudios muestran que la tasa de degradación y vida media varían con la profundidad, siendo más rápida en las capas más superficiales de los suelos tropicales que en suelos templados, en los tropicales la tasa de degradación se ha estimado en 0.05 día^{-1} y la vida media en 14, mientras que en los templados en $0,03 \text{ día}^{-1}$ y la degradación en 23 (Mosquera-Vivas et al., 2024).

En cuanto a la afectación biológica del suelo, el uso de este fungicida tiene impacto en la diversidad y estructura de las comunidades bacterianas, suelos con mayor concentración de pirimetanil presentan efectos estimulantes en la actividad de la deshidrogenasa (DHA) lo que conlleva a una mayor capacidad para afectar la diversidad microbiana y la utilización de

sustratos de carbono (Ng et al., 2014). Otros estudios con diversas especies del grupo Annelida señalan un importante efecto inhibitor en la actividad de las bombas de eflujo MXR (resistencia multixenobiótica) produciendo mayor retención de pesticidas en las células y aumentando la toxicidad en las lombrices de tierra (Shinn et al., 2015a; Velki et al., 2019).

2.1.5 Efecto en líneas celulares y humanos

Ensayos in vitro demuestran efectos citotóxicos significativos en diferentes líneas celulares humanas, reduciendo la producción de ATP y su viabilidad (Coleman et al., 2012). En líneas celulares no cancerosas como fibroblastos pulmonares MRC5 y queratinocitos de piel HaCaT, se ha observado una disminución en la viabilidad celular del 20 % a concentraciones bajas de 50 ng/μL, y una reducción entre un 40 % y un 60 % a concentraciones más altas de 150 ng/μL. Mientras que en líneas celulares cancerosas el pirimetanil ha tenido efectos diversos, la viabilidad de las células Hep G2 provenientes de cáncer de hígado registra una disminución entre un 40 y 60 % a una concentración de 150 ng/μL. Las células NT2/D1 de tumores germinales testiculares, registran una viabilidad notable de alrededor del 20 % a concentraciones bajas de 50 ng/μL, mientras que células SiHa de cáncer cervical muestran efectos citotóxicos significativos con una disminución en la viabilidad del 80 al 90 % a la concentración más alta de 300 ng/μL (Aleksić et al., 2019b),

En humanos las concentraciones por debajo del límite de ingesta diaria aceptable (ADI), no presenta problemas toxicológicos significativos, sin embargo personas con variantes genéticas específicas como portadores de alelos nulos de FLG demostraron una mayor absorción dérmica, las curvas de excreción presentan tasas más altas, lo que sugiere una mayor exposición y absorción del pirimetanil debido a una posible alteración en la barrera cutánea, afectando su potencial toxicidad (Liljedahl et al., 2021). En estudios de exposición oral la concentración máxima del metabolito del pirimetanil (OH-PYM) en orina alcanzó 12 μg/mL a 3 horas post-ingestión y el 80 % de la dosis administrada fue excretada dentro de las primeras 24 horas, mientras que en exposición dérmica, la concentración máxima de OH-PYM en orina fue significativamente menor de 0.6 a 0.9 μg/mL sugiriendo que la absorción dérmica es considerablemente menor en comparación con la vía oral, concluyendo que este fungicida tiene un bajo riesgo de acumulación en el cuerpo humano ya que es metabolizado y excretado rápidamente y sugiriendo que los riesgos para la salud son bajos sobre todo si se acatan normas de protección que minimicen su absorción (Faniband et al., 2019b).

2.1.6 Respuesta transcripcional al pirimetanil

Tras la exposición de *S. cerevisiae* a PYR, se han determinado cambios en la actividad transcripcional en el 28 % de su genoma (777 genes con mayor actividad y 900 con menor). Registrando una cantidad considerablemente mayor de genes afectados en una concentración inhibitoria máxima de (IC50). Destaca la actividad del gen MET28, que regula positivamente los genes de metionina, importante para mantener niveles adecuados de metabolitos como la arginina, la ornitina y la adenosilmetionina, además de los genes STR2 y STR3, que codifican para enzimas clave en la conversión de cisteína a homocisteína a través de la vía de transulfuración (Gil et al., 2014).

3 GEN REGULADOR TRANSCRIPCIONAL DE AZUFRE

3.1 Estructura genética.

El gen Regulador Transcripcional de Azufre 3 (STR3) de *S. cerevisiae*, se localiza en el cromosoma VII, en una región intergénica a aproximadamente 531 pares de bases del gen ascendente MND1 y a unos 309 pb del gen YGL185C. El gen de "División del Núcleo durante la Mitosis/Meiosis 1" (MND1) está directamente relacionado con su regulación, mientras que, el YGL185C contribuye a un mecanismo regulador del ciclo del glicoxilato, crucial en condiciones de ausencia de glucosa. (Figura 3). La región promotora STR3 contiene elementos reguladores conservados, como sitios de unión de factores de transcripción que responden a la disponibilidad de azufre confiriéndole características adaptativas al ambiente (Boniewska-Bernacka et al., 2006) (Chawla, 2017).

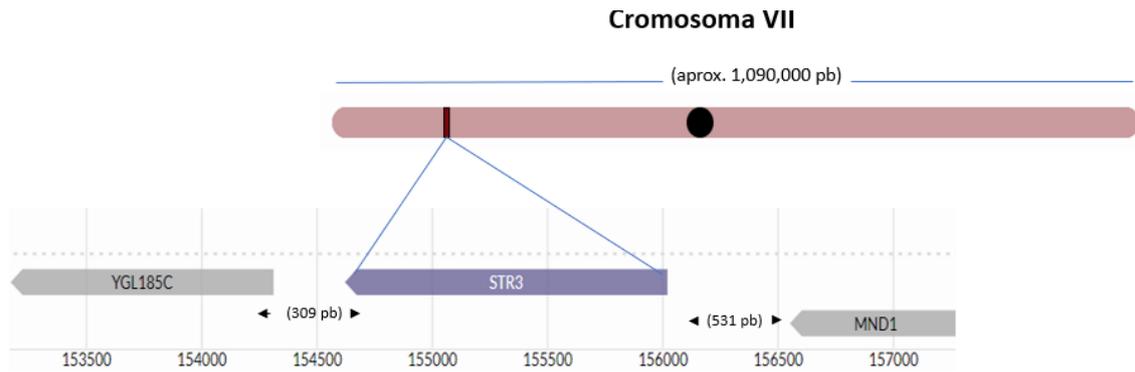


Figura 3. Localización cromosómica del gen *STR3* destacando la distancia intergénica con el gen *MND1* y el gen *YGL18C*. Adaptada de (*Saccharomyces Genome Database*, 2024)

3.2 Función y regulación transcripcional.

La enzima cistationina beta-liasa (CBL), esencial para la vía de transulfuración, es codificada por el gen *STR3*. Esta ruta metabólica implica la conversión de homocisteína a cisteína y permite la síntesis de proteínas, del glutatión, y de otros compuestos azufrados (Gai et al., 2021). El azufre es fundamental para diversos organismos siendo un componente esencial de aminoácidos, enzimas, proteínas, vitaminas y otras biomoléculas esenciales (de Bont et al., 2022). En *S. cerevisiae*, la asimilación de este elemento se da mediante transportadores de sulfato de alta afinidad SUL (Kankipati et al., 2015) y posteriormente los sulfatos convertidos a sulfuro permitirán la formación de la homocisteína mediante la enzima homocisteína sintetasa codificada por el gen *MET15* (Dhiman, 2019), mientras que en la transulfuración inversa, primero la homocisteína se convierte en cistationina mediante la enzima cistationina β -sintasa codificada por el *CYS4*, y posteriormente en cisteína mediante la cistationina γ -liasa codificada por *CYS3*; a partir de este punto la cisteína de reserva puede utilizarse en la síntesis proteica y la producción de glutatión (Cordente et al., 2019). Esta cisteína puede convertirse a través de dos reacciones sucesivas, en la primera interviene el gen *STR2* codificando la enzima cistationina γ -sintasa que convierte la cisteína en cistationina, para posteriormente darse la segunda reacción donde la activación del gen *STR3* permite la síntesis de la cistationina beta-liasa que convierte la cistationina en homocisteína que finalmente llevara a la producción de metionina mediante la activación sucesiva del gen *MET6* (Chawla, 2017). (Figura 4)

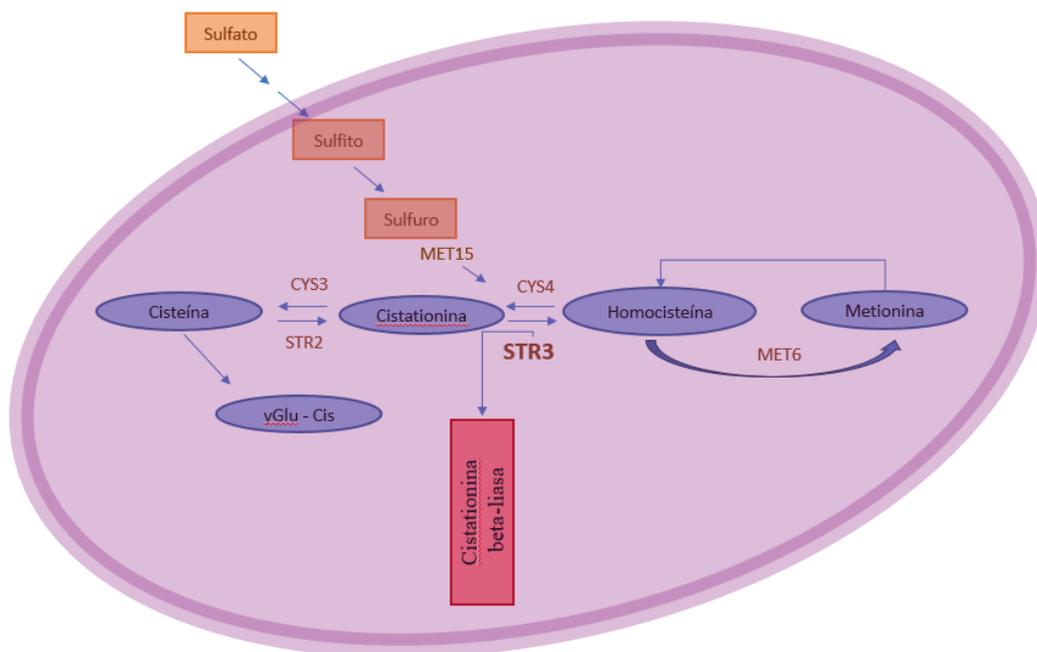


Figura 4. Asimilación de azufre y biosíntesis de metionina, cisteína y glutatión en *S. cerevisiae*. Recuadro rojo destaca la enzima cistationina. Adaptado de (Song et al., 2020)

La regulación transcripcional del *STR3* se relaciona estrechamente con la disponibilidad de azufre, fundamental para la supervivencia, permitiendo a *S. cerevisiae* adaptar su metabolismo en relación a fluctuaciones ambientales y necesidades nutricionales (Siew et al., 2005).

Otros ejemplos de cómo la expresión de *STR3* cambia en respuesta a diferentes condiciones metabólicas y ambientales constituyen la regulación de aminoácidos e hiperactivación génica. (Deshpande et al., 2017) reporta la sobreexpresión de *STR3*, junto con otros genes relacionados con el metabolismo del azufre y la biosíntesis de arginina y poliaminas ante la sobrecarga de cisteína. Los autores concluyen que la célula ante esta sobrecarga emplea una respuesta adaptativa compleja que incluye la detoxificación promoviendo la conversión de cistationina y contribuyendo significativamente al mecanismo de captura de tioles produciendo formas menos reactivas.

Por otra parte, la exposición a pesticidas u otros compuestos de índole tóxica puede inducir estrés celular que activa respuestas adaptativas, incluyendo la regulación de múltiples genes (Biermann & Hogan, 2022). La exposición de *S. cerevisiae* a distintas concentraciones de pirimetanil induce principalmente una respuesta transcripcional aumentada en genes del metabolismo de arginina (*ARG1*, *ARG3*, *ARG5,6*, *ARG8*, *ARG11*), metionina (*MET28*), cisteína y homocisteína (*STR2* y *STR3*); afectando genes relacionados con el metabolismo

energético y la asimilación de sulfato (Gil et al., 2014). Este mecanismo de respuesta podría ser similar en otro tipo de hongos, reflejando una respuesta adaptativa y conservada, donde la actividad transcripcional del *STR3* y genes relacionados reaccionan frente al estrés carbonílico, por ejemplo, en *Candida auris* el *STR3* y su gen ortólogo *CYS3* pueden ser inducidos frente a la exposición del metilglioxal, resaltando cómo la expresión génica en la síntesis de metionina y el metabolismo del azufre puede adaptarse a situaciones adversas y dando otro enfoque al estudio de la resistencia a antifúngicos (Martzoukou et al., 2022).

3.3 Implicaciones de la disfunción del *STR3*

La actividad transcripcional anómala del gen *STR3* tiene varias implicaciones a nivel celular y metabólico, la disfunción de su enzima cistationina beta-liasa interfiere en la vía metabólica de transulfuración, causando acumulación de cistationina y déficit de homocisteína (Martzoukou et al., 2022) que afecta la síntesis de proteínas y producción de glutatión, antioxidante de acción frente el estrés oxidativo y el envejecimiento prematuro (Strutynska et al., 2023). Además, *STR3* al estar regulado por factores de transcripción como *GCN4* y *MET4*, su disfunción puede alterar la respuesta celular a la disponibilidad de azufre y condiciones nutricionales o ambientales (Belda et al., 2017)

4 *S. cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDIO DE TOXICIDAD DE PESTICIDAS

Debido a múltiples características entre las que destaca su conservación evolutiva, relativa simplicidad de manejo, disponibilidad de datos ómicos, etc, *S. cerevisiae* se ha consolidado como un modelo eucariota ideal en diversas investigaciones, incluyendo estudios sobre toxicidad y ecotoxicidad, ha facilitado la identificación de mecanismos celulares y biomarcadores que permite una evaluación de los efectos tóxicos de determinados compuestos químicos, como pesticidas y contaminantes ambientales (Braconi et al., 2016). Su alta utilidad como biomonitor se ha puesto a prueba a través de cribados iniciales de toxicidad en diversos ecosistemas contaminados por pesticidas, posibilitando extrapolar evaluaciones complejas y detalladas a otros modelos animales (Poloni et al., 2020). Desde el 2002 en que se logró caracterizar un conjunto casi completo de mutantes de *S. cerevisiae*, cubriendo aproximadamente el 96 % de todos los ORFs (Open Reading Frames; Secuencias codificadoras de genes) anotados (Giaever et al., 2002) ha sido posible analizar

la función de genes en respuesta a estresores tóxicos, mediante cepas que presentan eliminación total o parcial de genes (perfilado homocigoto y perfilado de haploinsuficiencia), revelando inicialmente los mecanismos de acción tóxica de pesticidas como clorofenoles (Yadav et al., 2011), dieldrina y compuestos neonicotinoides, además de identificar las vías biológicas afectadas (North & Vulpe, 2010).

Posteriormente, en estudios más amplios de transcriptómica se ha podido comprobar reprogramación celular y efectos de otro tipo, por tal razón, ahora ese tipo de pesticidas están prohibidos. Como fue el caso del lindano, un insecticida que actúa como un neuroexcitador en animales a través de interferencias con la neurotransmisión de GABA, reconociendo inicialmente una sobreexpresión génica del 5 % en la levadura expuesta a concentraciones subletales (Parveen et al., 2003). En cuanto a herbicidas como la atrazina y fungicidas como el flusilazol análisis de microarrays determinaron cambios en los niveles de expresión en genes que también se encuentran en humanos y están involucrados con mecanismos de reparación y mantenimiento del ADN para el primer caso y en cuanto al fungicida se ha determinado su relación con varios genes de metabolismo de esteroides/ergosteroides, y la biosíntesis de lípidos (Minuzzo et al., 2006) (Sagatova et al., 2015). De este tipo de investigaciones pueden citarse diferentes perfiles de sobreexpresión génica mediante *S. cerevisiae* como modelo de estudio, pero entre los estudios cuyo resultado pueden extrapolarse a mecanismos de toxicidad en eucariotas superiores destaca la respuesta adaptativa al herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que tiene un rol pro-oxidante, y muestra sobreexpresión de genes de fosforilación oxidativa y la β -oxidación de ácidos grasos, como los genes de superóxido dismutasa (*SOD1*), aldosa reductasa (*GRE3*) y catalasa *T* (*CTT1*) (Teixeira et al., 2006). Análisis de mayor envergadura como los realizados con el thiuram han permitido determinar no solo la sobreexpresión de 142 genes, sino también la represión génica de 1443 que incluyen a la proteína ribosomal L4A (RPL4A), subunidad de la ARN polimerasa II (RPB7), y al factor de elongación de traducción 1 (TEF1) (Kitagawa et al., 2002). Respecto al Mancozeb, otro fungicida de amplio uso en Ecuador, se ha determinado la activación de antiportador de la membrana plasmática (FLR1) dependiente de YAP1, de la subunidad pequeña del ribonucleótido reductasa (RNR4), y la activación parcial del regulador de la resistencia pleiotrópica a fármacos (*YRR*) (Teixeira et al., 2008). A razón de citar estudios de relevancia en el mecanismo de adaptación de esta levadura se presenta la siguiente tabla que resume los efectos inducidos por pesticidas que no constan en los ya descritos.

Tabla 1. Efectos inhibitorios y cambios en la expresión génica inducidos por diferentes pesticidas en *S. cerevisiae*.

Pesticida	Tipo	Acción Inhibitoria	Efecto de exposición	Referencia
Thiuram	Fungicida de ditiocarbamato	Relacionado a mutagenicidad directa.	A 75 μ M y 30 min. 279 genes inducidos y 510 reprimidos; a 120 min, 688 genes inducidos y 1161 reprimidos. La toxicidad podría estar mediada por desnaturalización/degradación de proteínas, estrés oxidativo y mutagénesis.	(Kitagawa et al., 2002)
Benomil	Fungicida de benzimidazol	Crecimiento celular. Respuesta de estrés oxidativo dependiente del Yap1p.	228 genes sobreexpresados y 379 subregulados. Divergencias para los genes bajo el control de ScYap1p y Cgap1p.	(Lelandais et al., 2008)
Mancozeb	Fungicida de bisditiocarbamato de MG y Zn	Grupo sulfhídrico en aminoácidos.	Activación transcripcional de FLR1 dependiente de Yap1p y parcialmente dependiente de Rnr4p, Yrr1p o Pdr3p (resistencia pleiotrópica a fármacos).	(Teixeira et al., 2008)
Glifosato	Herbicida organofosforado	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos.	Proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos reducidas y niveles alterados de proteínas de respuesta al estrés.	(Braconi et al., 2010)
Dieldrin	Insecticida organoclorado	Alteración de propiedades electrofisiológicas y enzimáticas en membranas celulares nerviosas.	A IC20 se identificaron 427 mutantes sensibles y 320 mutantes resistentes. Alteración de genes relacionados a la utilización de nitrógeno, fosforilación de proteínas, regulación negativa de la señalización Ras. Alteración en la disponibilidad de leucina.	(Gaytán, Loguinov, Lantz, et al., 2013)
Toxaphene	Insecticida organoclorado	Desequilibrio en iones de sodio y potasio en neuronas.	130 mutantes sensibles y 542 resistentes, elongación de la transcripción, respiración aeróbica, biogénesis del complejo IV de cadena respiratoria mitocondrial y biosíntesis de aminoácidos aromáticos.	(Gaytán, Loguinov, Peñate, et al., 2013)
Acetamiprid	Insecticida neonicotinoide	Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) mediante unión irreversible.	Sobreexpresión de 112 genes. Los co-formulantes inducen más efectos adversos y afectan la biogénesis de la pared celular.	(Mattiazzi Ušaj et al., 2014)
Thiametoxam	Insecticida neonicotinoide	Receptores (nAChRs) mediante unión irreversible.	Sobreexpresión de 200 genes. Los co-formulantes inducen más efectos adversos y afectan la biogénesis de la pared celular.	(Mattiazzi Ušaj et al., 2014)
Imidacloprid	Insecticida neonicotinoide	Receptores (nAChRs) mediante unión irreversible.	Sobreexpresión de 86 genes. Los co-formulantes inducen más efectos adversos y afectan la biogénesis de la pared celular.	(Mattiazzi Ušaj et al., 2014)

Pesticida	Tipo	Acción Inhibitoria	Efecto de exposición	Referencia
Tribenuron-metil	Herbicida de sulfonilureas	Enzima acetolactato sintasa (ALS). Biosíntesis de aminoácidos ramificados.	Afectaciones al gen deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada (,,,,,) implicada en el metabolismo de leucina, isoleucina y valina. Disminución del crecimiento celular y en la muerte celular en concentraciones altas. Reducción de proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y niveles alterados de proteínas de respuesta al estrés.	(Braconi et al., 2009)(B. Song et al., 2022)
Fenoxaprop-P-etil	Herbicida de ariloxifenoxipropionatos	Acetil-CoA carboxilasa (ACCase). Biosíntesis de aminoácidos aromáticos.	Disminución de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y modificaciones en los niveles de proteínas asociadas a la respuesta al estrés. Afectación del gen ACC. Inhibición de ACCase interrumpiendo la síntesis de lípidos y formación de membrana celular.	(Braconi et al., 2010)(B. Song et al., 2022)
Thiram	Fungicida de carbamato	Diversos sistemas biológicos.	Reducción de hasta un 37 % del glutatión intracelular, combinado con endosulfan aumenta la producción de ROS.	(Harish & Shivanandappa, 2024)
Endosulfan	Pesticida organoclorado	Expresión génica	Reducción de los niveles de GSH en un 56.92 %. Aumento de la producción de ROS por un factor de 4.6 en la concentración LC50. Mortalidad Celular Alta a 1 mM y predominante necrosis.	(Harish & Shivanandappa, 2024)

4.1 *S. cerevisiae* como modelo de estudio de toxicidad del pirimetanil

El pirimetanil es un fungicida que se emplea ampliamente en la agricultura para controlar una variedad de enfermedades fúngicas en los cultivos afectando principalmente la síntesis proteica de hongos patógenos; no obstante, también es posible que este compuesto tenga efectos nocivos en organismos no objetivo, sugiriendo un efecto perjudicial para la salud humana y los ecosistemas. Para comprender los posibles peligros asociados con el uso extendido de este fungicida y para desarrollar métodos eficaces de mitigación, se han evaluado los efectos de exposición en *S. cerevisiae* en diversos trabajos citados desde el 2004 donde inicialmente estudiaron la producción de compuestos aromáticos y actualmente se centran en el uso de cepas específicas para estudios transcriptómicos y de proteomas, los cuales se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 2. Efectos del fungicida pirimetanil en *S. cerevisiae*: Cambios en la expresión génica, metabolismo y respuesta al estrés

Objetivo del estudio	Detalles del experimento	Principales hallazgos	Referencia
Evaluar el impacto de exposición en los compuestos aromáticos del vino	Diferentes cepas fueron expuestas y se midieron los ácidos, alcoholes y ésteres en los vinos resultantes.	Afectaron en la producción de algunos alcoholes y ésteres, pero las variaciones no fueron suficientes para alterar la calidad sensorial del vino.	(García et al., 2004)
Evaluar efecto del pirimetanil en el crecimiento y en la expresión génica global de <i>S. cerevisiae</i> .	Exposición de a concentraciones crecientes de 5 a 150 mg/L. Se utilizaron concentraciones de 20 mg/L y 110 mg/L para analizar cambios en la expresión génica mediante microarrays y qRT-PCR.	Regulación diferencial de 1677 genes, 777 sobreexpresados y 900 reprimidos. Los genes relacionados con metabolismo de arginina y aminoácidos azufrados fueron notablemente sobreexpresados. La concentración 110 mg/L o IC50 provocó un mayor número y diversidad de categorías funcionales afectadas	(Gil et al., 2014)
Evaluación de la toxicidad de la escorrentía contaminada con pirimetanil en la expresión génica de <i>S. cerevisiae</i> .	Se expuso <i>S. cerevisiae</i> a muestras de escorrentía de suelos contaminados con 50× y 100× del fungicida, midiendo la expresión de los genes ARG3, 5 y 6.	La exposición a las muestras de escorrentía aumentó significativamente la expresión de los genes ARG3, 5 y 6 en comparación con el control, incluso con concentraciones de ≤ 1.4 mg/L.	(Gil et al., 2015)
Comparar las respuestas transcriptómicas a seis pesticidas incluyendo el pirimetanil	Se expuso el modelo a concentraciones sub-letales de seis pesticidas durante 2 horas. Se evaluaron los perfiles transcriptómicos que causaron IC del 20 % mediante RT-qPCR y microarrays	Se determinaron patrones transcriptómicos diferenciables entre los seis pesticidas. Se predijeron mecanismos de toxicidad y respuesta demostrando una correlación con los efectos inhibitorios del crecimiento.	Gil et al., 2018

4.2 Aplicación de *S. cerevisiae* en biología sintética y desarrollo de biosensores

4.2.1 Biosensor: Estructura y clasificación

En el campo de la Biología Sintética, el análisis y caracterización de las condiciones ambientales e intracelulares no solo son factores esenciales para la adaptación y supervivencia de los organismos, sino que también abren una ventana para futuras aplicaciones analíticas y de diagnóstico (Denton & Gokhale, 2020). En este contexto, surgen los biosensores, que se definen como dispositivos analíticos que combinan un componente biológico como enzimas, anticuerpos, tejidos, orgánulos o células completas con un detector fisicoquímico de analitos emitiendo una respuesta mediante señales eléctricas, térmicas u

ópticas (Baldini & Minunni, 2019). Estos dispositivos permiten la evaluación de entornos ecológicos, destacándose por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez, lo que los convierte en una herramienta importante para el desarrollo de tecnologías avanzadas en monitoreo y detección (Chalklen et al., 2020).

Un biosensor se compone esencialmente de los siguientes elementos (Hassani et al., 2017):

Biorreceptor: Componente biológico encargado de reconocer y unirse de manera específica al analito objetivo, esta especificidad se debe a las interacciones biomoleculares altamente selectivas, induciendo cambios en determinadas propiedades fisicoquímicas que posteriormente serán convertidas en señales detectables y cuantificables por un transductor.

Transductor: Elemento crucial para transformar las señales biológicas en datos que puedan ser amplificados, almacenados y registrados; convierte las variaciones fisicoquímicas en una señal medible; su clasificación se basa en la caracterización de dicha señal pudiendo ser electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, térmicos, entre otros.

Sistema Conductor de procesamiento y visualización: Componente que procesa la señal generada por el transductor, la amplifica y la convierte en un formato determinado que permite la interpretación de los resultados.

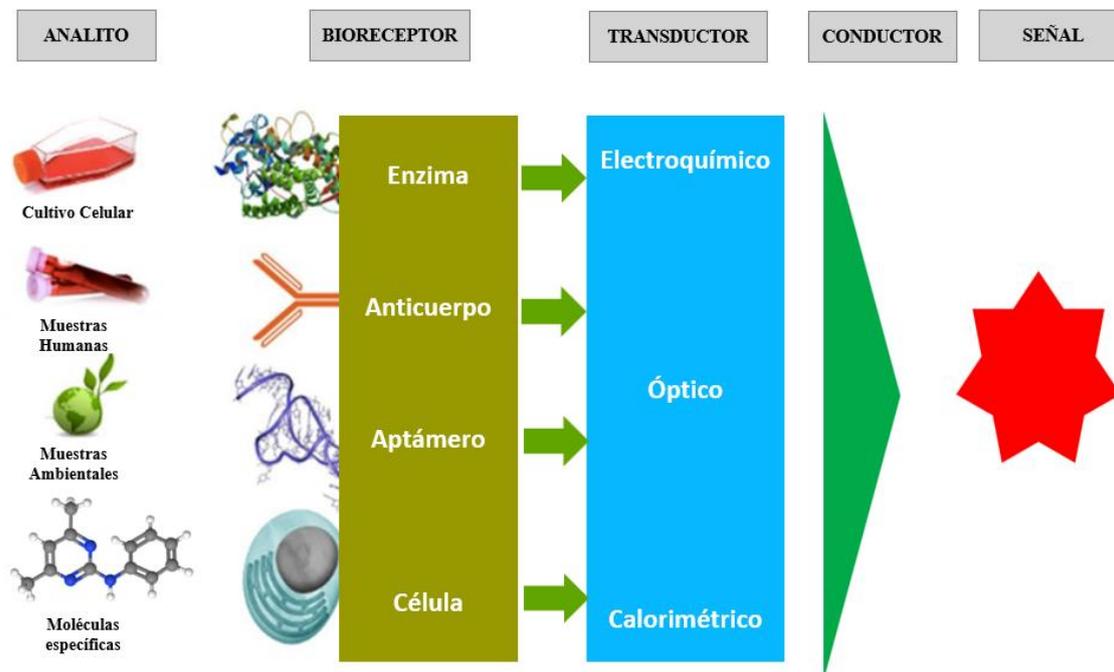


Figura 5. Componentes fundamentales de un biosensor: Bioreconocimiento, interfaz y transducción.

Adaptado de (Hassani et al., 2017)

La clasificación general de los biosensores se basa en diferentes criterios, como: El mecanismo de detección, tipo de transductor y según el componente biológico empleado. En el caso específico de los biosensores basados en levaduras (YBB), la clasificación se centra en el mecanismo de detección, diferenciándose en dos categorías: Dependientes e independientes de la transcripción.

4.2.2 YBB Dependientes de la transcripción

Son dispositivos biológicos que utilizan un gen reportero regulado por un promotor inducible diseñado para detectar la presencia de un ligando específico, ya sea directamente a través de un dímero ligando/receptor o mediante una cascada de señalización intracelular; el gen produce una señal medible, como fluorescencia, bioluminiscencia o colorimetría, que refleja la presencia y concentración del analito objetivo (Qiu et al., 2020). Tanto los receptores como los promotores de estos sistemas pueden ser nativos de la levadura o adaptados de otros organismos y se pueden modificar para aumentar la funcionalidad en aplicaciones específicas (Dabirian et al., 2019a).

En general, este tipo de biosensores se subdivide en función del sistema reportero que usan, los cuales tienen propiedades particulares que los hacen adecuados para diferentes aplicaciones, siendo los más comunes los basados en:

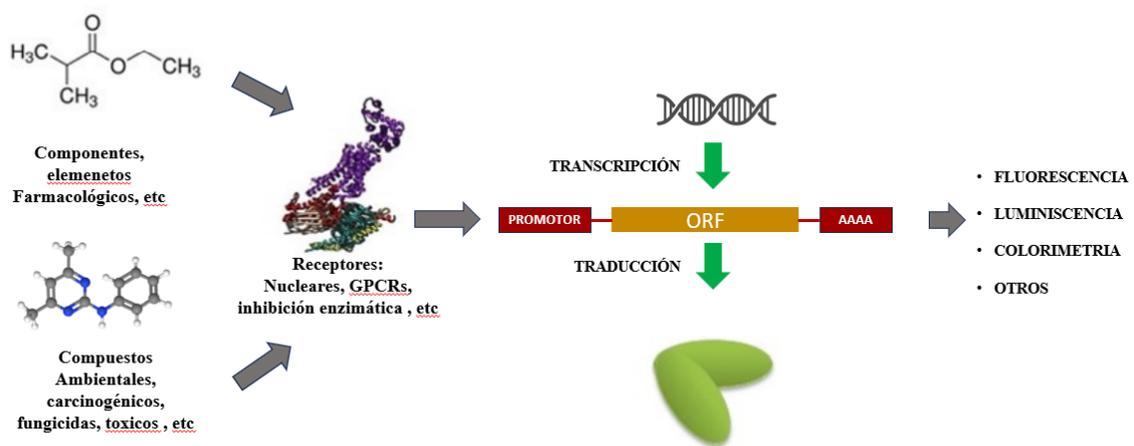


Figura 6. Esquema de reconocimiento del ligando de interés en un biosensor de levadura dependiente de transcripción. Adaptado de (Adeniran et al., 2015)

Las proteínas reporteras son una herramienta de biología molecular útil para estudiar el comportamiento de los genes, su expresión en proteínas, localización celular y otros eventos biológicos; a continuación, se describen las más relacionadas con lo hasta aquí descrito.

Proteínas fluorescentes: Se basan en la activación de receptores acoplados a proteínas que emiten luz cuando son excitadas por una longitud de onda específica y que pueden ser detectadas mediante microscopía de fluorescencia. No requiere la adición de sustratos ni disrupción celular, permitiendo completar ensayos en un periodo de 4 a 6 horas; por lo que este enfoque es ideal para estudios de expresión génica en tiempo real y aplicaciones que requieren monitoreo continuo en células vivas (Adeniran et al., 2015).

La variedad de proteínas fluorescentes utilizadas en *S. cerevisiae* abarca diversas variantes diseñadas para aplicaciones específicas, la Proteína Verde Fluorescente (GFP) aislada de la medusa *Aequorea victoria* es una de las proteínas más comunes en estudios de localización y dinámica de proteínas, conocida por su capacidad de emitir luz verde después de ser excitada (Nguyen et al., 2021). Otra proteína relacionada es la Proteína Fluorescente Amarilla (YFP), utilizada principalmente en técnicas de doble etiquetado, donde se requieren dos colores diferentes para observar interacciones proteicas (Peter et al., 2017). Otra opción en estudios multicolor es la Proteína Fluorescente Roja (RFP) y su variante más estable mCherry, derivada de la anémona *Discosoma*, (Chia & Gleeson, 2013). Finalmente y dentro de variantes más avanzadas se encuentran la cian (CFP) que es utilizada en combinación con YFP para estudios de interacción molecular mediante resonancia de transferencia de energía por fluorescencia (FRET) (Hippe et al., 2018).

Bioluminiscencia: Se basa en la emisión de luz mediante la oxidación de un sustrato por la enzima Luciferasa, aprovechando la emisión de fotones producto de la reacción (Kaskova et al., 2016). Ya que que la luz del sistema no se emite a través de la exposición a energía luminosa, no se requiere luz específica y funciona espontáneamente durante la reacción, siendo utilizados en sistemas amplificadores y detección de campo; estos métodos se caracterizan por tiempos de respuesta de relativamente rápido, de aproximadamente 6 horas (Adeniran et al., 2015).

Colorimetría: Basada en la enzima Beta-galactosidasa, es uno de los métodos más utilizados en biosensores dada su practicidad y bajo costo, utiliza la capacidad de la enzima

para hidrolizar sustratos cromogénicos produciendo un cambio de color detectable en un espectrofotómetro (Nguyen et al., 2021).

4.2.3 YBB Independientes de la transcripción

A diferencia de biosensores que dependen de la transcripción para producir una señal detectable, es decir la activación de un gen reportero, los biosensores transcripcionalmente independientes emplean mecanismos basados en proteínas o cambios conformacionales para detectar principalmente analitos tales como: alcoholes, azúcares, lactato, metales y metabolitos intracelulares, permitiendo una respuesta más rápida y menos susceptible a interferencias o variabilidad (Lind et al., 2024). Sin embargo, el diseño de estos puede ser más complejo, pues requiere la optimización de las interacciones proteína-proteína. Además los sutiles cambios conformacionales de estas pueden ser difíciles de detectar, limitando su sensibilidad (Pu et al., 2017). Se clasifican dependiendo de su sistema reportero, siendo los más comunes: proteínas fluorescentes, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, proteínas de unión a ácidos nucleicos, receptores acoplados a proteínas G.

Proteínas fluorescentes: Se basan en dominios de unión a ligandos con proteínas fluorescentes. El analito produce un cambio conformacional, alterando la intensidad o espectro de la fluorescencia sin la necesidad de transcripción génica (Samokhvalov et al., 2018).

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia: En un biosensor FRET, las moléculas donadoras y el aceptor son proteínas o nanomateriales fluorescentes como puntos cuánticos (QDs), siendo un proceso no radiactivo en el que la energía se transfiere de una molécula donadora excitada a la aceptora fluorescente cercana (Samokhvalov et al., 2018).

Proteínas de unión a ADN o ARN: Se basan en la unión a secuencias específicas de ADN o ARN en respuesta a un ligando, al estar acoplados a una proteína generan una señal directa que puede reconfigurar determinadas secuencias modificando la actividad de una enzima o la fluorescencia de una proteína previamente silenciada (Munzar et al., 2019).

Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs): Son una familia de proteínas transmembrana que median la comunicación entre el exterior y el interior de la célula, actúan como sensores para una diversidad de estímulos como fotones, iones, hormonas, transmisores y otros ligandos que una vez unidos al receptor en el exterior, activan proteínas G en el interior desencadenando la señalización involucrada principalmente con aumento de los niveles del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Weis & Kobilka, 2018). En *S. cerevisiae*, la única GPCR está implicada en la vía de apareamiento por feromonas, cuyas señales y cambios conformacionales constituyen biomarcadores de toxicidad y al presentar gran semejanza estructural y funcional entre la subunidad alfa de proteínas G de la levadura, Guanosina fosfato activada 1 (Gpa1), y las subunidades G α en los mamíferos puede reiterarse la importancia de este modelo en estudios de señalización y toxicidad (Lengger & Jensen, 2020).

4.3 Desarrollo de biosensores mediante *Saccharomyces cerevisiae*

La extensa caracterización científica de *S. cerevisiae* ha consolidado a este organismo como un modelo ideal para el desarrollo de biosensores eficientes, su capacidad de ser genéticamente modificada junto a su robustez y versatilidad en entornos adversos ha permitido su uso en la detección de una amplia variedad de compuestos, desde contaminantes ambientales hasta metabolitos intracelulares (Martin-Yken, 2020) (Miyake et al., 2022). La integración de biología sintética y biología estructural asistida por computación, impulsa el desarrollo de tecnologías de biosensores basadas en esta levadura ya sea como organismo natural o modificado genéticamente; estos progresos abren nuevos horizontes prometedores en una variedad de industrias, como la industria alimentaria, el monitoreo ambiental, los materiales de construcción, los cosméticos y el desarrollo de medicamentos (Ostrov et al., 2017).

La eficacia de *S. cerevisiae* como biosensor radica en su capacidad de reaccionar ante sustancias específicas mediante cambios en su metabolismo, actividad enzimática o expresión génica (Dabirian et al., 2019b) (Snoek et al., 2020a). Estas respuestas pueden traducirse en señales cuantificables, como expresión y variaciones en fluorescencia (Patel et al., 2019) o alteraciones de actividad redox, permitiendo una detección precisa y de tiempo relativamente menor (Zhao et al., 2019). Otro aspecto importante a tomar en cuenta en este punto es, que mediante este modelo es posible incorporar genes reporteros incrementando

su especificidad en posibles aplicaciones en biotecnología, industriales (Parapouli et al., 2020), salud (Pereira et al., 2021) y medio ambiente (Z. X. Zhang et al., 2021).

Las siguientes tablas resumen y destacan la diversidad de aplicaciones para la detección de diversos elementos mediante ingeniería de biosensores basados en esta levadura. Los primeros trabajos analizados se han centrado en varios grupos de contaminantes medioambientales con mecanismos de acción bien caracterizados junto a dianas moleculares, presentando dos enfoques: el primero centrado en contaminantes que comparten potenciales biológicos o tóxicos específicos en una mezcla (por ejemplo, grupos de orgánicos biodegradables, compuestos estrogénicos, etc. Y segundo, biosensores altamente específicos para compuestos individuales (metales pesados o ácido okadaico), Siendo el nivel de especificidad determinado en cada elemento analizado.

Tabla 3. Aplicación de biosensores basados en *S. cerevisiae* para la detección de compuestos relacionados a estudios ambientales.

Compuestos Detectados	Tipo de Respuesta (LoD o EC50 si Disponible)	Método de Detección (Gen Reportero)	Referencias
Detección de Contaminantes en el Medio Ambiente	Compuestos Tóxicos	Sí/No	Luminescencia (<i>Luc</i>), disminución de la viabilidad (Hollis et al., 2000)
	Compuestos estrogénicos (Disruptores endocrinos)	Sí/No (2 ng/L), (20 ng/L), (0.4 nM)	Colorimetría (<i>LacZ</i>), fluorescencia (<i>LacZ</i>), fluorescencia (yEGFP) (Bovee et al., 2004)
	Compuestos androgénicos y anti androgénicos	Cuantificación (15 nM para testosterona), cuantificación (5 nM)	Sistema de dos híbridos (<i>LacZ</i>), sistema de dos híbridos (GFP) (Ogawa et al., 2010)
	Metales pesados	Cuantificación (0.5 mM Cu ²⁺), (5 x 10 ⁻⁷ M Cu ²⁺), (5 x 10 ⁻⁷ M Cu ²⁺), (1 μM Cu ²⁺)	Amperometría (<i>LacZ</i>), fluorescencia (GFP), luminescencia (<i>Luc</i>), colorimetría (ADE2) (Vopálenká et al., 2015)
Toxinas Marinas	Ácido okadaico, pectenotoxina-11, portimina	(19 nM OA)	Colorimetría (<i>LacZ</i>) (Richter & Fidler, 2015)
	Ciguatoxinas	(0.1 ng/L PCTX3C)	Colorimetría o fluorescencia (<i>LacZ</i>) (Martin-Yken et al., 2018)

En el contexto del uso de genes como secuencias promotoras para controlar la expresión de proteínas reporteras se presentan las siguientes tablas, que especifican los genes reporteros para cada caso. La multiplicidad de estudios coincide en dos principales grupos: los genes

promotores inducibles por glucosa y los inducibles por estrés que regulan respuestas a determinadas condiciones como la exposición a iones u otros estresores ambientales (Tran et al., 2018).

Tabla 4. Aplicación de biosensores basados en *S. cerevisiae* en diversas aplicaciones biomédicas y biológicas.

Compuestos Detectados		Tipo de Respuesta	Método de Detección (Gen Reportero)	Referencias
Detección de Compuestos en Salud	Glucocorticoides (cortisol, corticosterona)	Cuantificación (0.3 μ M)	Amperometría o bioquímica (phyK)	(Pham et al., 2015)
	Medicamentos (omeprazol, lansoprazol)	Cuantificación (95 μ g/L)	Amperometría o bioquímica (phyK)	(Pham et al., 2015)
	Micotoxinas (T-2 toxina y otras tricotecenas)	Sí/No	Inhibición del crecimiento (halo de disco)	(Mclaughlin et al., 2009)
	Tricotecenas (micotoxinas)	Cuantificación (1 pg/L)	Colorimetría (<i>LacZ</i>)	(Mclaughlin et al., 2009)
	Zearalenona y otros compuestos con actividad estrogénica	Cuantificación (1 μ g/L)	Construcción metabólica	(Mitterbauer et al., 2003)
Dominio Médico	Patógenos (de cualquier tipo)	Cuantificación (rango de nM)	SPR (presentación de antígenos en superficie celular)	(Venkatesh et al., 2015)
	Patógenos fúngicos	Sí/No (rango de nM)	Colorimetría, GPCR (Ostrov et al., 2017) [33]	(Mclaughlin et al., 2009)
	Carcinógenos, genotóxicos	Cuantificación (rango de mg/mL)	Frecuencia de Reversión (ensayo DEL)	(Sambrani et al., 2019)
	Procarcinógenos	Cuantificación (rango de μ g/mL)	Expresión de CPR-CYP y RAD54-GFP	(Sambrani et al., 2019)
	Inhibidores de PI3K (relacionados con la oncogénesis)	(rango de μ M)	Vía de PI3K reconstituida	(Fernández-Acero et al., 2012)
Tamices	Compuestos anti-maláricos con actividades similares a la artemisinina	Sí/No (rango de μ M)	Inhibición del crecimiento	(Mohamad et al., 2012)
	Inhibidores de la proteasa del citomegalovirus humano	(rango de μ M)	Sistema de cribado específico del objetivo (HTS)	(Cottier et al., 2006)

5 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En Ecuador, el manejo inadecuado de plaguicidas es uno de los principales problemas en las mayores zonas de producción agrícola, problema que se ve agravado por el hecho de que solo el 25 % de los productores ha recibido supervisión o capacitación (INEC, 2020); no existe un registro específico sobre la cantidad o tipo de fungicidas importados anualmente y la información existente corresponden a diversas fuentes, generalmente relacionadas a casas comerciales de importación. Es así que, los registros principalmente realizados por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) o el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), suelen enfocarse en la superficie, producción agropecuaria y uso de fertilizantes o agroquímicos en general. Por lo tanto, la falta de un sistema adecuado de vigilancia y monitoreo para el uso de fungicidas, como el pirimetanil, plantea riesgos significativos para la salud pública y el medio ambiente.

Este escenario confluye en un una interrogante crucial acerca de cómo optimizar la detección y el control de estos compuestos, pues la falta de herramientas precisas y accesibles para detectar fungicidas en productos agrícolas representa un desafío, que limita la identificación de posibles efectos adversos y la implementación oportuna de medidas correctivas.

La Biología Sintética mediante el desarrollo de biosensores basado en *S. cerevisiae* ha demostrado una alta sensibilidad y viabilidad en la detección y regulación de diversos compuestos incluyendo fungicidas (Snoek et al., 2020b). Por lo tanto, estos podrían ser utilizados de manera más accesible y comparable en eficiencia con metodologías tradicionales que requieren instrumentos sofisticados y operadores altamente calificados como el western blot, cromatografía o espectrometría de masas. Asimismo, los biosensores celulares no requieren una intervención especializada ni energía externa (C. Gu et al., 2019), lo que marca un progreso revolucionario en la supervisión de condiciones tanto ambientales como intracelulares.

Ante la problemática planteada y la aplicabilidad de los biosensores celulares, la presente investigación propone usar la expresión de un gen reportero de *S. cerevisiae* como parte de la construcción de un biosensor de pesticidas.

6 OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la expresión del gen *STR3* como elemento funcional en el diseño de un biosensor basado en *Saccharomyces cerevisiae*, para la detección específica y cuantificación de fungicidas de uso común en la agricultura ecuatoriana

Objetivos específicos

- Clonar el promotor del gen *STR3* en el vector pUG35
- Validar la integridad del plásmido modificado pUG35 que incluya la secuencia promotora *STR3* fusionado al gen reportero GFP.
- Evaluar el efecto del fungicida pirimetanil en el crecimiento de la cepa BY4742 “Wild Type” y modificada de *S. cerevisiae*.
- Evaluar la expresión del gen reportero GFP bajo condiciones de estrés inducidas por el fungicida pirimetanil.
- Cuantificar los niveles de fluorescencia generados por la levadura modificada en respuesta a diferentes concentraciones del fungicida.
- Evaluar la aplicabilidad y especificidad del modelo propuesto.

7 METODOLOGÍA

7.1 Amplificación de la región promotora *STR3*

La secuencia de los cebadores se definió exclusivamente para las condiciones experimentales de este trabajo y fueron dirigidos al gen *STR3* de *S. cerevisiae*.

Su diseño se realizó mediante herramientas bioinformáticas. Inicialmente, se empleó la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para verificar la secuencia del gen y confirmar su correspondencia con la cepa BY4742. Se empleó la plataforma Benchling (<https://www.benchling.com/>) para el diseño, selección de sitios de restricción y posterior síntesis, asegurando que cumplieran con los parámetros óptimos de PCR.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 µl, compuesta por 5 µl de tampón 10X PCR (sin Mg), 1 µl de una mezcla de dNTPs a 10 mM, 1.5 µl de MgCl₂ a 50 mM, 100 ng de ADN genómico de *S. cerevisiae*, 1 µl de cada cebador a una concentración de 10 µM, 1 unidad de Platinum Taq DNA Polymerase, y agua destilada hasta completar el volumen. El protocolo de amplificación incluyó una desnaturalización inicial de 1 minuto a 95 °C, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 52 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 30 segundos y una extensión final de 4 minutos a 72 °C.

5'p*STR3*inf

5'CAAAAGCTG**GAGCTC**GCCACACATCCCATAGCTCTGTGTG3'

3'p*STR3*inf

5'CATGTCGAG**GTCGAC**CTTTTGCTTCTATGCTTTTGTTGTTTGC3'

Sitios de corte en la secuencia

7.2 Cepas y Plásmidos

7.2.1 *Escherichia coli*

Se empleó a *Escherichia coli* DH5 α (F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK- mK+) deoR thiE1 supE44 gyrA96 relA1) como el hospedador para la clonación del plásmido, ya que esta cepa es ampliamente reconocida por su alta eficiencia en la transformación y la capacidad para mantener plásmidos con estabilidad (Kostylev et al., 2015). Fue cultivada en medio LB a 37 °C con agitación orbital y la selección de las colonias transformadas se realizó en placas de agar LB suplementadas con 100ug/ml de ampicilina.

7.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Para la evaluación de la expresión del plásmido pUG35 con promotor *STR3* en un sistema eucariota, se utilizó la cepa BY4742 *S. cerevisiae* de genotipo MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0. Fue cultivada en medio YNB-Glucosa a 30 °C con agitación orbital y la selección de las colonias transformadas se realizó en placas de agar YNB-Glucosa sin uracilo.

De igual manera, esta misma cepa fue utilizada para la evaluación de la expresión de plásmido control positivo (pUG34) aplicando las mismas condiciones y medios anteriormente descritos, con la adición de todos los aminoácidos que requería la cepa excepto histidina.

7.2.3 Vector plasmídico pUG35

En el presente trabajo se utilizó el vector pUG35 modificado (Figura 7) para incluir el promotor del gen *STR3* en lugar del promotor original MET17. Este vector está diseñado para la expresión y visualización de proteínas fusionadas a GFP mediante microscopía de fluorescencia y cuyas principales características son:

Resistencia a antibióticos: Contiene el gen Amp^R, que confiere resistencia a ampicilina en bacterias, permitiendo su selección desde concentraciones de 100 μ g/mL.

Promotor MET17: contiene promotor regulable MET17 de *S. cerevisiae*, que controla la expresión de los genes insertados bajo condiciones de presencia o ausencia de metionina. En este estudio esta secuencia fue remplazada por el promotor *STR3*.

Marcador de selección auxotrófica: contiene el gen URA3 como marcador de selección auxotrófica, ideal para cepas como BY4742.

Proteína fluorescente verde (GFP): diseñado para la fusión de proteínas de interés con GFP en su extremo C-terminal.

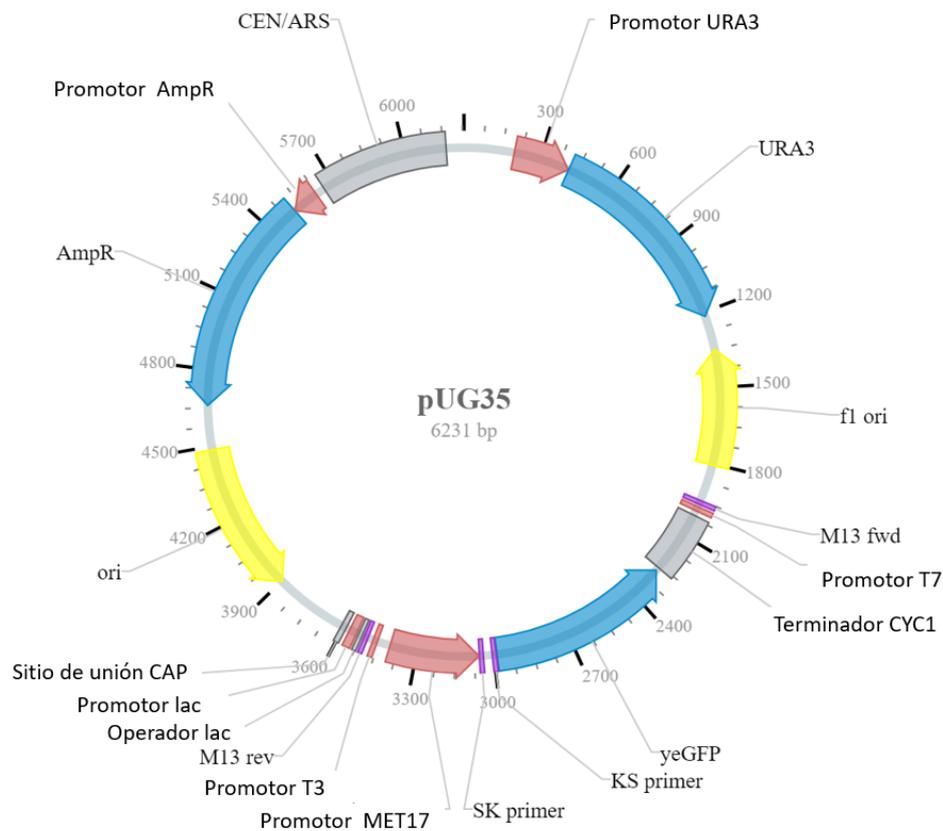


Figura 7. Mapa vectorial de plásmido pUG35. Adaptado de NovoPro Labs (2024).

7.2.4 Vector plasmídico pUG34 (control positivo)

Para verificar la correcta funcionalidad del sistema de expresión GFP en *S. cerevisiae*, se empleó el plásmido pUG34 de 6297pb como control positivo (Fig.8). Cuyas principales características son:

Resistencia a antibióticos: el plásmido contiene el gen AmpR, que confiere resistencia bacteriana a la ampicilina.

Promotor MET: regulado por metionina, en ausencia de este aminoácido el promotor MET activa la expresión de GFP, controlando su expresión en función de sus niveles en el medio de cultivo".

Marcador autotrófico: el gen HIS3 proporciona un marcador auxotrófico para histidina permitiendo la selección de células de *S. cerevisiae* en medios deficientes del aminoácido.

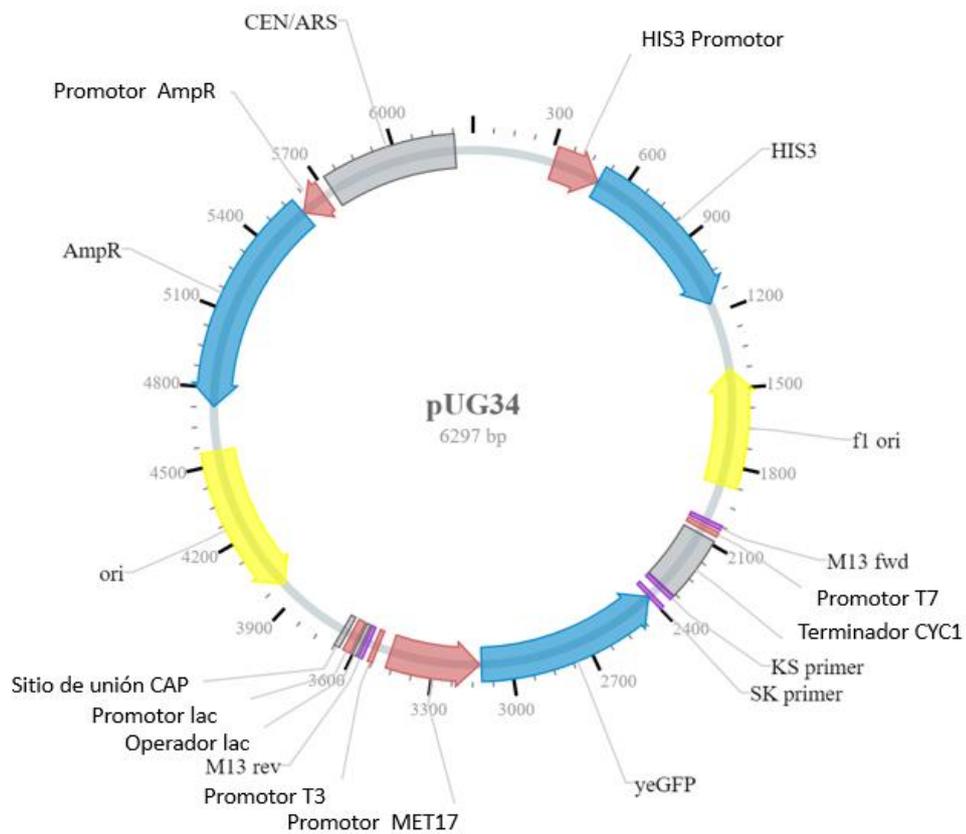


Figura 8. Mapa vectorial de plásmido pUG34. Adaptado de NovoPro Labs (2024).

Tabla 5. Plásmidos y cepas usados en el estudio

Nombre	Genotipo	Referencia
pUG35	URA3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3	Niedenthal et al., 1996
pUG34	HIS3, CEN/ARS, PMET25::yEGFP3	Niedenthal et al., 1996
35-PSTR3	pUG35, PYGL184C::yEGFP3	Este estudio
BY4742	MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0	EUROSCARF
DH5α	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1	Casali and Preston, 2003

7.3 Enzimas de restricción.

Liberación del promotor:

Las enzimas para la liberación del promotor original MET17:

SacI: Sitio de reconocimiento: 5'-G↓TCGAC-3' que genera extremos cohesivos

(sticky ends):

SallI: Sitio de reconocimiento: 5'-GAGCT↓C-3' que genera extremos cohesivos

(sticky ends):

Digestión del plásmido con promotor *STR3*:

SacI: Sitio de reconocimiento: 5'-GAGCT↓C-3' que genera extremos cohesivos.

EcoRV: Sitio de reconocimiento: 5' - GAT↓ATC - 3' que genera extremos cohesivos romos:

Digestión del control positivo pUG34:

SacI: Sitio de reconocimiento: 5'-GAGCT↓C-3' que genera (sticky ends).

EcoRI: Sitio de reconocimiento: 5'-G↓AATTC-3' que genera extremos cohesivos.

7.4 Formulaciones y medios de cultivo

Todos los medios de cultivo, tampones y soluciones de stock fueron esterilizados de acuerdo a especificaciones (autoclave o filtro de membrana), las soluciones de aminoácidos y nutrientes adicionales se añadieron según las necesidades de cada cepa y se detallan en las siguientes tablas.

Tabla 6. Composición medio mínimo de levadura con bases nitrogenadas (YNB) y dextrosa. (Sherman, 2002)

Componente	Composición
Base nitrogenada de levadura	6,7 g
Dextrosa	20 g
Agar-agar(solo para medio sólido)	20 g
Agua destilada	1 L

Tabla 7. Concentraciones de aminoácidos(Sherman, 2002)

Componente	Concentración Final (mg/L)	Stock (mg/ml)
L-Lysine	30	10
L-Histidina	20	10
L-Leucina	60	10
Uracilo	20	2

Tabla 8. Composición del medio rico YPD (Extracto de levadura, peptona, dextrosa) (Sherman, 2002)

Componente	Composición
Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Dextrosa	20 g
Agar-Agar (solo para medio sólido)	15 g
Agua destilada	1L

Tabla 9. Composición del medio LB

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	5
Peptonas	10
NaCl	10
Agar (solo para medio sólido)	15

Tabla 10. Reactivos para células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α

Reactivo	Composición/Concentración
Cultivo de <i>E. coli</i> DH5 α	5x10 ⁸ células
Glicerol	10 %

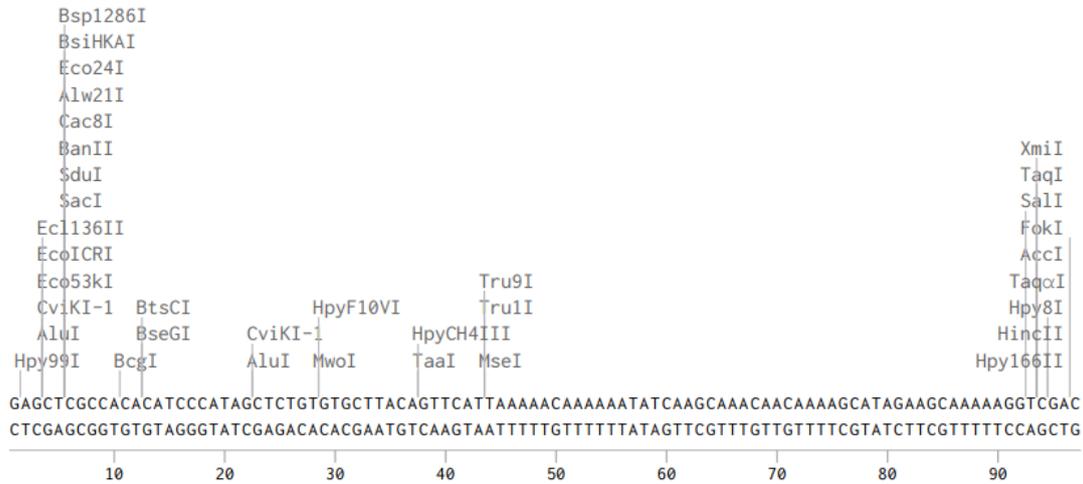


Figura 10. Secuencia promotora del gen *STR3* y detalle de sitios de restricción

Los productos de digestión y amplificación fueron tratados con las mismas enzimas de restricción para generar extremos cohesivos y permitir su ligación en el vector. La reacción de ligación se llevó a cabo usando ligasa T4 a 16 °C durante toda la noche.

Para verificar la correcta inserción de la secuencia promotora *STR3*, se aisló el ADN plasmídico y se llevó a cabo la transformación en células competentes, las colonias obtenidas fueron sometidas a un análisis de restricción y al obtener el patrón esperado de corte se procede a la secuenciación para una validación final. La comparación de la secuencia obtenida con la secuencia esperada fue realizada mediante la plataforma blast del ncbi (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

7.6 Transformación.

7.6.1 Extracción y purificación del ADN plasmídico

Para la extracción y purificación del ADN plasmídico de las colonias de *E. coli* DH5α transformadas, se utilizó el Thermo Scientific™ GeneJET Plasmid Miniprep Kit, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La calidad de concentración del ADN plasmídico fue verificada mediante espectrofotometría.

7.6.2 Preparación de células electro competentes.

La preparación de células electro competentes de *E. coli* DH5 α y *S. cerevisiae* se llevó a cabo siguiendo los protocolos establecidos en el manual del electroporador Gene Pulser Xcell Electroporation System, específicos para cada tipo de microorganismo.

En los cultivos preliminares se inoculó una colonia aislada de *E. coli* DH5 α en 10 mL de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación a 160 rpm durante 16 horas, y así obtener un cultivo de alta densidad, que posteriormente fue ajustado mediante mediciones en espectrofotómetro para obtener la concentración celular que especifica el protocolo de electroporación. De igual manera, se inoculó una colonia de *S. cerevisiae* en 10 mL de medio YNB-glucosa + histidina, leucina, lisina y se incubó a 30 °C con agitación a 160 rpm durante toda la noche.

7.6.3 Electroporación

El proceso de transformación de células electro competentes de *Escherichia coli* y *S. cerevisiae* se realizó mediante electroporación, utilizando el sistema Gene Pulser Xcell Electroporation System de Bio-Rad y siguiendo las instrucciones del manual del equipo.

Se emplearon cubetas de electroporación de 0,2 cm y con el fin de preservar la viabilidad celular, todas las manipulaciones previas al pulso eléctrico se realizaron en condiciones de frío sobre hielo. Cada transformación utilizó un volumen de 40 μ l de suspensión celular mezclado con 1-2 μ l de ADN plasmídico.

Para las bacterias, los parámetros fueron: capacitancia (C) de 25 μ F, resistencia en paralelo (PC) de 100 ohm y voltaje (V) de 2,9 kV. En el caso de la levadura, los valores ajustados fueron: C=25 μ F; PC=200ohm; V=1,5kV

Después de la recuperación de las células transformadas, el procedimiento se completó mediante la siembra en medios de cultivo específicos para cada organismo.

7.7 Evaluación del efecto del PYR en el crecimiento y expresión de GFP

El fungicida de nombre comercial Lombardo, cuyo ingrediente activo es el Pirimetanil, fue adquirido de un distribuidor local autorizado para la venta e importación de productos agrícolas en Urcuquí, provincia de Imbabura. Este producto está registrado a nivel nacional con el código 93-F12/NA, y es formulado por la empresa china: Ningbo Sunjoy Agrosience Co., Ltd. Se presenta en una formulación de suspensión concentrada (SC) y de composición: Pirimetanil 400g/l y aditivos la cantidad suficiente para (c.s.p) 1 L.

7.7.1 Preparación de cultivos y controles

Para evaluar el efecto del fungicida pirimetanil en el crecimiento y expresión de GFP en la cepa de *S. cerevisiae* modificada, se incluyeron dos controles adicionales. El control negativo consistió en la cepa BY4742 *S. cerevisiae* sin modificaciones genéticas, mientras que el control positivo fue el plásmido pUG34, el cual sirve como referencia para la expresión basal de GFP en un medio sin metionina. Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

Cepa p *STR3*-GFP: YNB glucosa, suplementado con histidina, leucina y lisina.

Control negativo (BY 4742 sin modificaciones genéticas): YNB glucosa, suplementado con histidina, leucina, lisina y uracilo,

Control positivo (plásmido pUG34): YNB glucosa, suplementado con leucina, lisina y uracilo (para permitir el crecimiento de levaduras - URA3 +HIS3).

Estos cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C con agitación orbital constante a 160 rpm; la densidad óptica (DO₆₀₀) de los cultivos se midió al día siguiente utilizando un espectrofotómetro y se diluyeron en el mismo medio para ajustar la DO₆₀₀ a 0.2. Una vez alcanzada la DO₆₀₀ de 0.2, se permitió que los cultivos continuaran creciendo hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4, momento en el cual se inició la exposición a diferentes concentraciones de pirimetanil para registro de curvas de crecimiento e intensidad de fluorescencia.

7.7.2 Exposición a pirimetanil (Curvas de crecimiento)

Todas las cepas de levadura se cultivaron en 25 ml de medio mínimo YNB con glucosa, suplementado con los aminoácidos requeridos se expusieron a diferentes concentraciones de pirimetanil durante distintos períodos de tiempo. La adición del fungicida se realizó con volúmenes correspondientes a 8, 16 y 88 µL para obtener concentraciones de 10 mg/L, 20 mg/L y 110 mg/L, respectivamente. Se recolectaron muestras cada 2 horas para análisis microscópico y evaluación de la expresión de GFP mediante fluorescencia.

7.7.3 Exposición a pirimetanil (Intensidad de fluorescencia)

Para evaluar el efecto del fungicida en la expresión de la GFP, se establecieron diferentes condiciones experimentales que incluyen 6 concentraciones de pirimetanil y 4 tiempos de exposición que se resumen en la siguiente tabla. Cada combinación de concentración y tiempo se identifica con una categoría específica y se modifican del trabajo de (Gil et al., 2014):

Tabla 12. *Tratamientos experimentales para la evaluación de intensidad de fluorescencia*

Tiempo (horas)	Concentración de Pirimetanil					
	0mg/L	5mg/L	10mg/L	15mg/L	20mg/L	110mg/L
0	T0C0	T0C1	T0C2	T0C3	T0C4	T0C5
2	T2C0	T2C1	T2C2	T2C3	T2C4	T2C5
4	T4C0	T4C1	T4C2	T4C3	T4C4	T4C5
8	T8C0	T8C1	T8C2	T8C3	T8C4	T8C5

Cada celda representa la intensidad de fluorescencia medida para una combinación específica de concentración y tiempo de exposición en un volumen de 25 ml, por ejemplo: T8C5 representa un registro a 8 horas de exposición al fungicida con una concentración de 110mg/L, de esta manera se pudo evaluar cómo varía la expresión de GFP en respuesta a diferentes niveles de estrés inducido por el fungicida y en distintos períodos.

7.7.4 Expresión de GFP bajo control del promotor *STR3* en respuesta a Pirimetanil.

Para cuantificar, comparar e interpretar de la manera más precisa los registros de fluorescencia de GFP en la cepa BY 4742 transformada con el vector pUG35-*PSTR3*, se utilizaron dos controles experimentales durante la observación de las células bajo el microscopio de fluorescencia:

El control positivo fue la cepa modificada con el vector pUG34 que expresó GFP de manera constitutiva, permitiendo verificar la presencia de la proteína fluorescente en condiciones ideales.

El control negativo fue la cepa “Wild Type” que confirmó que en ausencia de la proteína GFP no había fluorescencia basal.

7.8 Análisis de microscopía de fluorescencia

Previo del análisis de fluorescencia, las células fueron fotografiadas utilizando el modo de Campo Brillante de Luz Transmitida (TL.BF), con una exposición de 35,5 milisegundos (ms) y una ganancia de 2,9, manteniendo los demás parámetros en sus valores predeterminados definiendo el número de células en cada campo visual, posteriormente, se empleó el filtro específico GFP con una exposición de 600 ms y una ganancia de 2,9 para la detección de la proteína fluorescente. Para cada tratamiento, se prepararon placas portaobjetos y se analizaron cinco campos visuales, utilizando el objetivo de 40x. Las imágenes fueron capturadas en formato TIFF con una resolución de 2560x1920i, que garantiza una alta calidad para el análisis posterior.

7.9 Cuantificación automática de fluorescencia

Después de fijar las muestras utilizando solución salina amortiguada con fosfato (PBS) / etanol y registrar las imágenes correspondientes, se llevó a cabo el análisis de fluorescencia empleando el software ImageJ en su versión 1.53.

Inicialmente se aplicó una máscara binaria sobre el canal verde establecido para GFP, el ajuste de umbrales y reducción de ruido se realizó mediante funciones de procesamiento como: Fill Holes y Watershed. Para destacar las células de interés y filtrar las partículas según su tamaño se definió un rango de área de 5 a 12 μm . Se identificaron y contabilizaron las células utilizando la función: Analyze Particles. En la obtención de datos sobre la intensidad de fluorescencia de las regiones de interés definidas, se utilizó la opción "Measure" para un total de 10 células por cada condición experimental.

Se repitió este proceso tres veces por célula para la obtención de valores cuantitativos de: intensidad total, promedio de fluorescencia, densidad integral y otros parámetros relevantes como el área de interés analizada (ROI). El mismo procedimiento se aplicó y por triplicado al fondo de la imagen.

Para la generación de una lectura precisa de la fluorescencia, se cuantificó la intensidad del fondo o del ruido fuera de las células y posteriormente, estos valores de fondo se restaron de los valores de intensidad registrados en el interior de las mismas.

8 RESULTADOS

8.1 Clonación

8.1.1 Amplificación de la secuencia promotora *STR3*

Con el objetivo de obtener la secuencia promotora del gen *STR3* a partir del genoma de *S cerevisiae*, se obtuvo un fragmento de 122 pb mediante la técnica de PCR. Para ello, se emplearon los iniciadores específicos 5'pSTR3inf y 3'pSTR3inf, cuyas secuencias y las condiciones de amplificación están descritas previamente en la sección de metodología. La amplificación fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. (Figura 11).

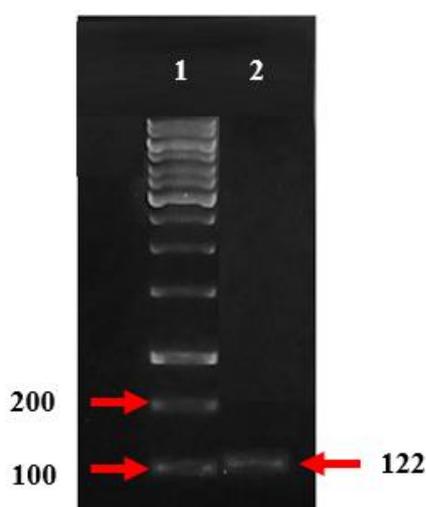


Figura 11. Gel de agarosa 1 %. Columna 1: Marcador de peso en pb. Columna 2 secuencia promotora *STR3* de 122pb

Posteriormente, el amplicón *STR3* fue sometido a una digestión enzimática con: *SacI* y *Sall*, mismas enzimas de restricción se usaron en el vector pUG35, para generar extremos cohesivos y permitir su ligación en el vector.

8.1.2 Modificación del vector pUG35

El promotor MET17 fue eliminado para permitir la inserción del promotor *STR3*. Este proceso fue llevado a cabo mediante digestión enzimática durante una hora a 37 °C. Los sitios flanqueantes de la secuencia promotora liberaron un fragmento de 449 pb en las siguientes secuencias de corte:

SacI: Sitio de reconocimiento:

5'-G
3'-CTCGAC

Sall: Sitio de reconocimiento

5'-G
3'-CTCG

La correcta liberación del promotor fue confirmada mediante electroforesis (Figura 12)

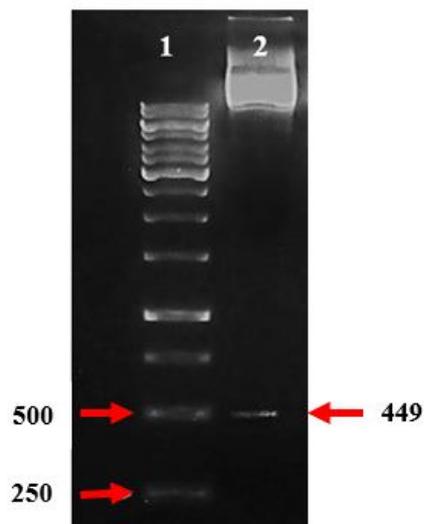


Figura 12. Gel de agarosa 1%. Columna 1: Marcador de peso en pb. Columna 2 vector pUG35, fragmentado.

El vector pUG35 y el amplificado del promotor de *STR3* digeridos con las enzimas de restricción fueron purificados a partir de un gel de electroforesis con agarosa Low Melting Point.

Posterior a la ligación enzimática y con el fin de verificar la correcta inserción de la secuencia promotora *STR3*, se llevó a cabo una secuenciación del nuevo constructo. La comparación entre las secuencias obtenida y esperada fue realizada mediante la plataforma blast del ncbi (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) y así obtener una validación final para su uso en los experimentos posteriores.

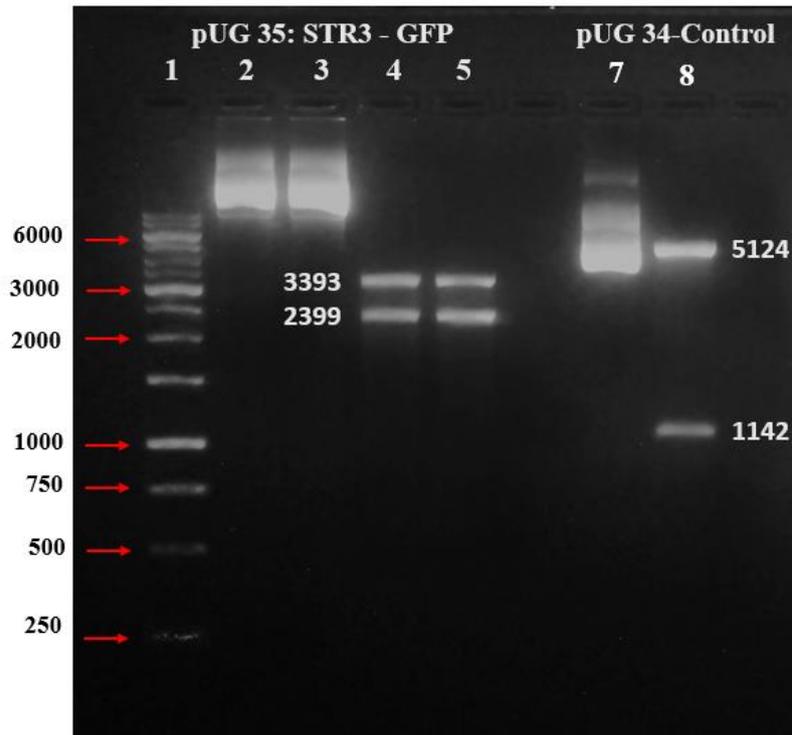


Figura 14. Gel de agarosa 1 %. Columna 1: Marcador de peso en pb. Columnas 2 y 3: ADN plasmídico del vector pUG35: STR3-GFP. Columnas 4 y 5: Corte enzimático de pUG35: STR3-GFP. Columna 7: ADN plasmídico del vector pUG34-Control. Columna 8: Corte enzimático de vector pUG34-Control

Además, se utilizó un análisis de secuenciación para validar la conformación y precisión del constructo plasmídico. Los resultados obtenidos se compararon con el modelo creado utilizando la plataforma en línea Benchling, esta comparación confirmó que la secuenciación coincidía exactamente con el modelo previsto, asegurando la integridad del constructo y su idoneidad para las aplicaciones experimentales detalladas mas adelante.

La secuencia verificada es la siguiente:

```

GGAGATGGGCCGCATTAAGCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTG GAGCTC GCCACACATCCCATAGCTC
TGTGTGCTTACAGTTCATTA AAAACA AAAAATATCAAGCAAACA AAAAGCATAGAAGCAAAAAG GTCG
ACCTCGAC ATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTACTGGTGTGTC CCCAATTTGGTTGAATTAGATGGTGA
TGTAAATGGTCACAAATTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTA
AAATTTATTTGACTACTGGTAAATTGCCAGTTCATGGCCAACCTTAGTCACTACTTTCCGGTTATGGTGT
TCAATGTTTTCGAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGT
TATGTTCAAGAAAGAACTATTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTG
AAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTA AAAAGGTATTGATTTAAAGAAGATGGTAA CATTTIAGGTC
ACAAATTTGGAATACA ACTATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACA AAAAGAATGGTATCAAA

```

GTTAACTTCAAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCTGACCATTATCAACAAAATACT
CCAATTGGTGATGGTCCAGTCTTGTACCAGACAACCATTACTTATCCACTCAATCTGCCTTATCCAAAG
ATCCAAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTGTAGAAATTGTTACTGCTGCTGGTATTACCCATGGTAT
GGATGAATTGTACAAA TAA

Sitio de reconocimiento enzimático

Secuencia Promotora *STR3*

Secuencia GFP

Adicionalmente, se utilizó la base de datos de promotores eucariotas (Eukaryotic Promoter Database) para confirmar la presencia y funcionalidad del promotor *STR3* en la secuencia obtenida: https://epd.expasy.org/cgi-bin/epd/get_doc?db=scEpdNew&format=genome&entry=STR3_1. Su representación grafica y ubicación en esta plataforma se representa en la figura 15.

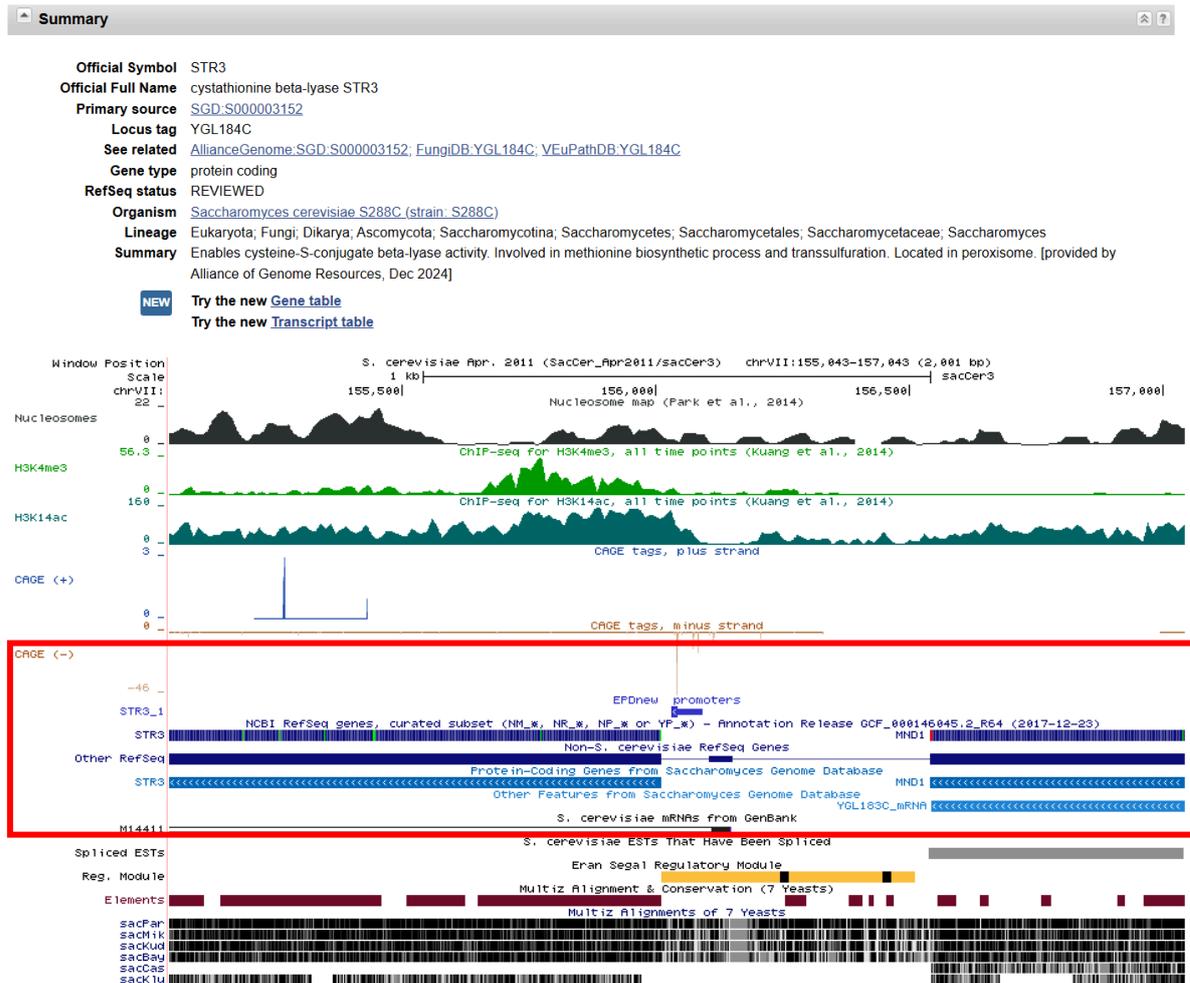


Figura 15. Representación gráfica del promotor STR3 de *S. Cerevisiae* y detalle del navegador genómico UCSC (Eukaryotic Promoter Database.2023). Se destaca breve descripción, secuencia y posición genómica. El recuadro rojo resalta la secuencia promotora en el constructo STR3 ascendente al gen MND1.

8.3 Transformación

La preparación de células electro competentes y transformación de *E. coli* y *S. cerevisiae* se llevó a cabo mediante los protocolos del manual del Gene Pulser Xcell Electroporation System. Una vez completada la electroporación, las células se recuperaron en un medio de cultivo adecuado y especificado en el manual, finalizado este periodo de incubación, las células fueron sembradas en placas de agar selectivas. YNB-Glucosa /Histidina/Leucina/Lisina para BY4742 modificada con pUG35-PSTR3 y YNB-Glucosa

/Leucina/Lisina/Uracilo para el control positivo de fluorescencia. El desarrollo de las colonias transformadas y de BY 4742 “Wild Type” se detalla en las imágenes a continuación.

Desarrollo de Colonias de Levaduras Transformadas con pUG35-STR3

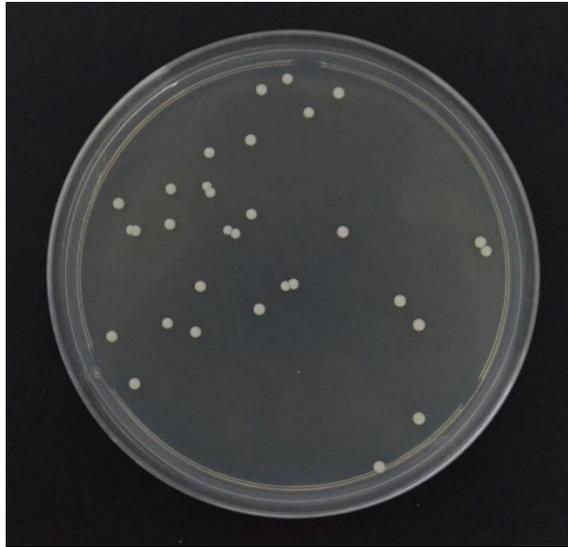


Figura 16. Crecimiento de colonias transformadas de S. cerevisiae BY4742 con PUG35-PSTR3 en medio YNB-Glucosa /Histidina/Leucina/Lisina

Desarrollo de Colonias Transformadas con pUG34 (Control positivo de fluorescencia)



Figura 17. Crecimiento de colonias transformadas de S. cerevisiae BY 4742 con pUG34 (Control positivo de fluorescencia) en medio YNB-Glucosa /Leucina/Lisina/Uracilo

Desarrollo de Colonias de Levaduras “Wild Type”



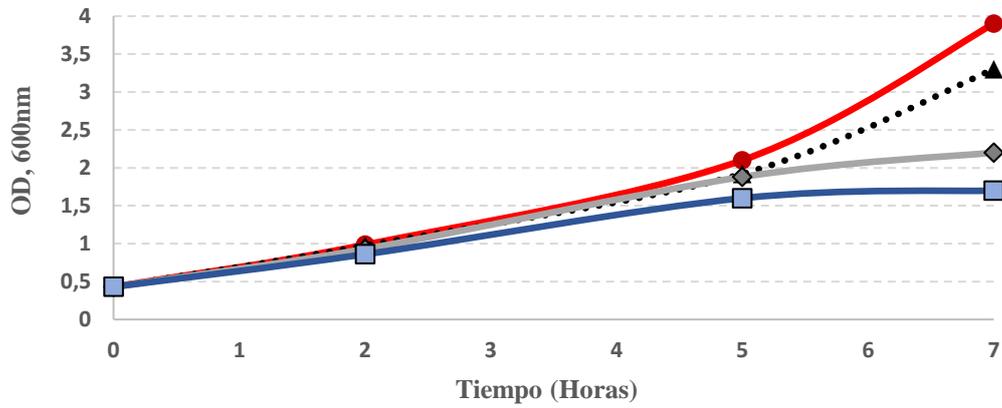
Figura 18. Crecimiento de colonias de S. cerevisiae BY4742 en medio YNB Glucosa /Histidina/Leucina/Lisina/Uracilo

8.4 Curvas de crecimiento

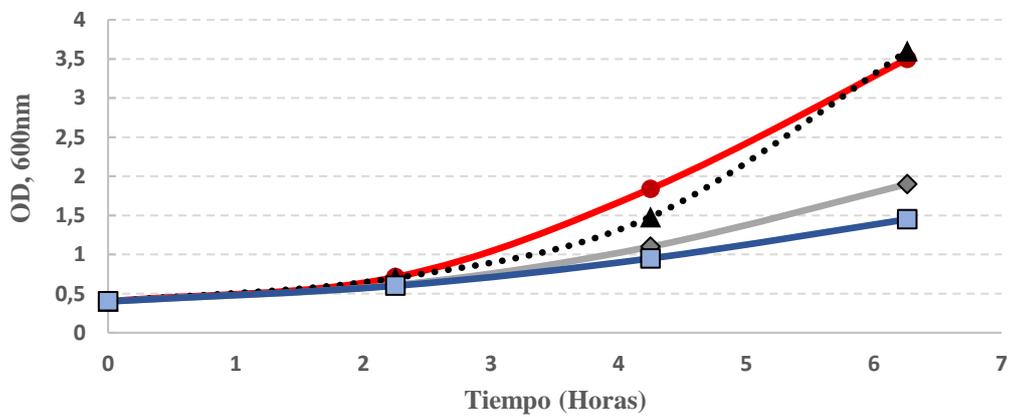
A continuación, se presentan los resultados sobre el efecto del pirimetanil en el crecimiento de BY4742 “Wild Type” y BY4742 modificada con el vector pUG35-PSTR3 de interés. Cada experimento de exposición al pesticida se realizó 3 veces.

8.4.1 Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* BY4742 "Wild type"

1era. Curva de crecimiento BY4742 "Wild Type"



2da. Curva de crecimiento BY4742 "Wild Type"



3ra. Curva de crecimiento BY4742 "Wild Type"

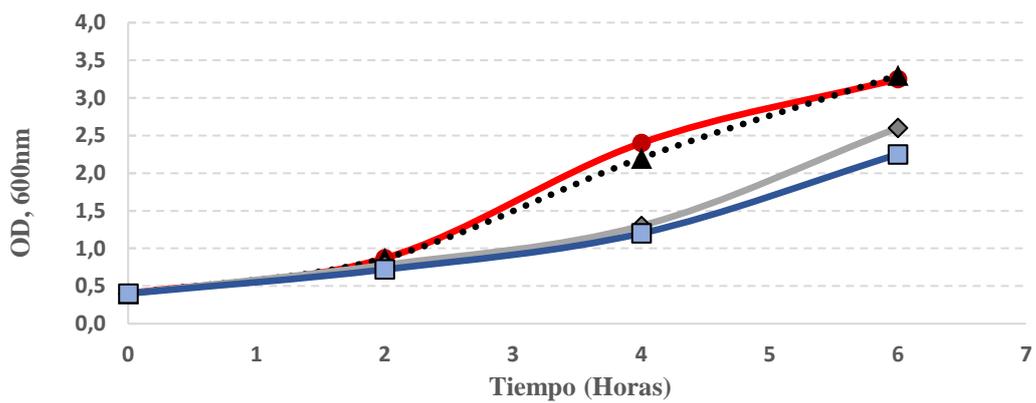


Figura 19. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* BY4742 "Wild Type" expuesta a cuatro concentraciones de pirimetanil.

Los datos de la Figura 19 representan tres curvas de crecimiento de la cepa BY 4742 no modificada, expuesta a diferentes concentraciones de pirimetanil (PYR): 0 mg/L (control), 10 mg/L, 20 mg/L y 110 mg/L y en varios registros de tiempo.

De entre los valores más significativos del experimento de exposición al fungicida, la muestra control mostró un crecimiento exponencial en cada una de las tres curvas de crecimiento, valores de OD que aumentaron de 0,4 a 3,25 en alrededor de 6 horas para la primera y segunda curva y valores cercanos a 4 en alrededor de 7 horas en la tercera, por lo que sigue un patrón típico en ausencia del fungicida. En cuanto a la exposición de 10mg/L no se aprecian diferencias considerables; a 20mg/L se registra un crecimiento ligeramente menor y a 110 mg/L existe una marcada reducción con valores de OD de 0,42 a 1.5 en 6 horas y a 2,25 como valor máximo a 7 horas registrado únicamente en la tercera curva, lo que es significativamente más bajo que el control y a otras concentraciones, demostrando el efecto inhibitorio de las concentraciones más altas.

Los resultados en todos experimentos muestran que el factor concentración tiene impacto notable sobre los niveles de densidad óptica, destacando las concentraciones de 20 y 110 mg/L.

8.4.2 Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* BY 4742 modificada con el vector 35-pSTR3.

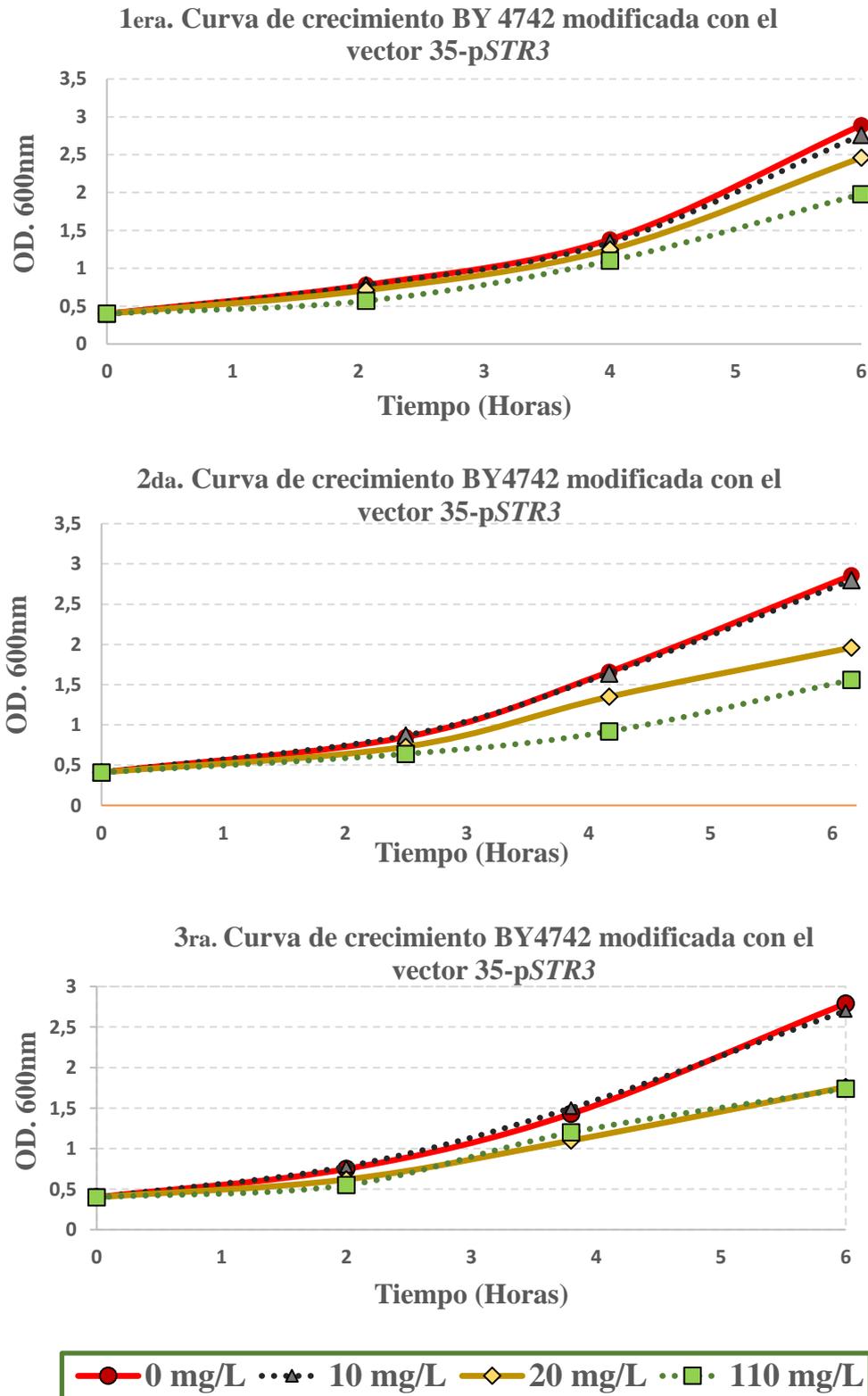


Figura 20. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* modificada con BY4742/PSTR3-GFP.

Los datos de la Figura 20 representan tres curvas de crecimiento de la cepa BY4742 con el vector pUG35 modificado con el promotor *STR3* a diferentes concentraciones de pirimetanil (PYR): 0 mg/L (control), 10 mg/L, 20 mg/L y 110 mg/L en un registro de 6 horas.

Las gráficas destacan cómo el fungicida afecta al crecimiento de la levadura dependiendo de la concentración y el tiempo. En general a las 2 horas, las levaduras expuestas a 10 y 20 mg/L crecieron ligeramente, alcanzando de 0,71 a 0,78 de OD respectivamente para cada curva, pero este aumento no tiene significancia estadística al compararse con la concentración de 110 donde se disminuye el crecimiento a alrededor de 0,5 en los tres gráficos, indicando un efecto inhibitorio inmediato.

Este patrón en el cual el crecimiento disminuye dependiendo de la concentración, se mantiene hasta las 6 horas donde las concentraciones de 10 mg/L y 20 mg/L registran OD superiores a 110 mg/L, el crecimiento se limita a aproximadamente 1,98 como valor máximo en la primera curva y disminuyendo para las dos restantes, reafirmando el impacto inhibitorio severo del fungicida en esta fase final y a máxima concentración.

8.5 Número de Células y Porcentaje de fluorescencia

Para determinar cuántas células presentaban fluorescencia, por cada una de las 24 condiciones experimentales se observaron cinco campos, se determinó el número total de células en condiciones de transmisión de luz (TL BF) y posteriormente, se utilizó el filtro de GFP para contabilizar cuántas de estas tenían fluorescencia.

Los resultados a continuación se presentan en la siguiente tabla, donde la columna correspondiente a Promedio de células (TL-BF), representa el número promedio de células observadas del total de los 5 campos por tratamiento y observadas sin filtro de fluorescencia. En la tabla 13, la columna correspondiente a Promedio de Células (GFP) indica el número promedio de células que mostraron fluorescencia bajo el filtro de GFP y observadas en los 5 campos.

Finalmente, la columna Fluorescencia (%) presenta el porcentaje de células que presentaron fluorescencia (GFP) respecto al total de células observadas (TL-BF) en cada condición.

Tabla 13. Promedio de células observadas en cinco campos 40x bajo cada condición experimental.

Concentración de Pirimetanil	Tiempo (Horas)	Promedio de Células (TL-BF)	Promedio de Células (GFP)	Fluorescencia (%)
0 mg/L	0	81,0	12,8	14,4
	2	45,0	24,0	
	4	63,7	7,7	
	8	61,0	13,0	
5 mg/L	0	69,8	11,5	20,0
	2	98,0	37,7	
	4	59,0	18,0	
	8	37,0	13,0	
10 mg/L	0	66,3	9,3	19,4
	2	81,3	32,0	
	4	87,7	9,3	
	8	87,0	27,0	
15 mg/L	0	64,5	11,5	17,5
	2	78,0	10,0	
	4	96,7	12,7	
	8	67,0	36,0	
20 mg/L	0	110,5	33,3	16,7
	2	70,7	10,0	
	4	96,7	12,7	
	8	34,0	11,0	
110 mg/L	0	66,5	14,8	16,9
	2	70,0	13,0	
	4	63,7	18,0	
	8	46,0	22,0	

8.6 Evaluación de la Intensidad de fluorescencia de GFP

El registro fotográfico obtenido del microscopio de fluorescencia fue analizado en ImageJ, que cuantificó la intensidad como densidad de intensidad (intDen). Una vez procesados los datos, se seleccionaron las diez células con mayor valor para su inclusión en la siguiente tabla. Intensidad Promedio de Fluorescencia en respuesta a tratamientos de pirimetanil

Tabla 14. Intensidad de fluorescencia en respuesta a tratamientos de pirimetanil

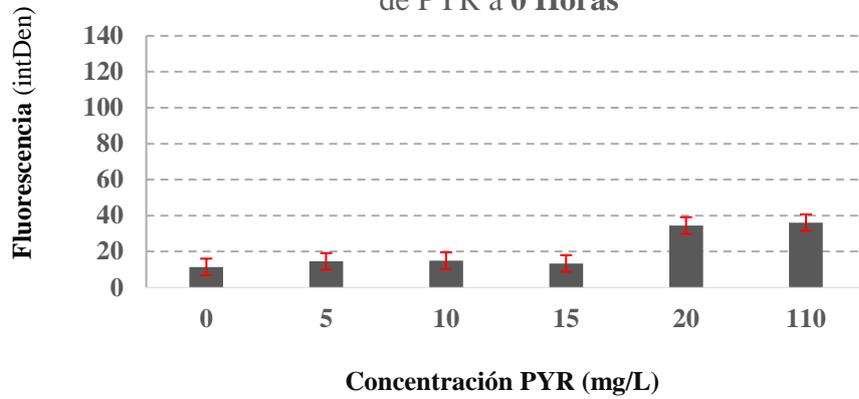
Exposición PYR	Tiempo (Horas)			
	0	2	4	8
0 mg/L	11,45	49,10	39,80	28,15
5 mg/L	14,53	108,32	102,45	64,78
10 mg/L	14,94	68,69	71,27	87,76
15 mg/L	13,40	81,70	75,66	111,78
20 mg/L	34,48	100,73	93,16	121,24
110 mg/L	36,05	110,05	146,66	105,01

Los datos muestran un aumento progresivo en la intensidad de fluorescencia en función de la concentración y tiempo de exposición a PYR. Aunque con algunas fluctuaciones del factor tiempo, este patrón de incremento es consistente con la variación de las condiciones experimentales, sugiriendo una relación dosis-respuesta, donde la activación del sistema reportero *STR3-GFP* está directamente relacionada a las condiciones de exposición. Este efecto es particularmente pronunciado en las concentraciones de 20 mg/L y 110 mg/L, que registran la mayor intensidad cuantificada.

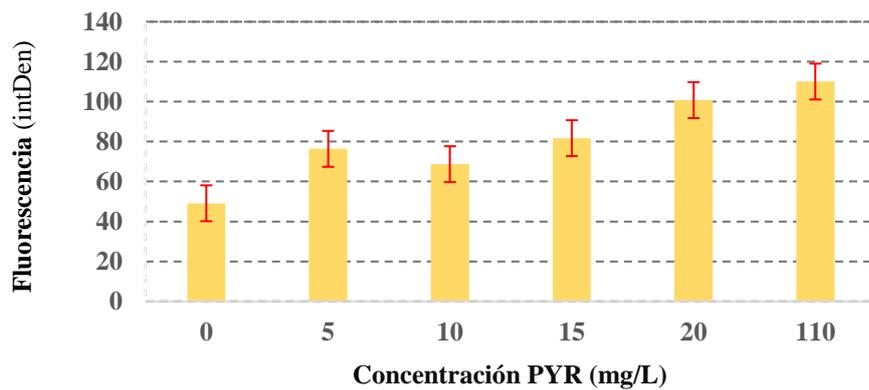
La siguiente figura representan los valores de intensidad de fluorescencia en función de factor tiempo. Se presentan 4 gráficos correspondientes a 0.2, 4 y 8 horas.

Intensidad de fluorescencia en función de 4 registros de tiempo

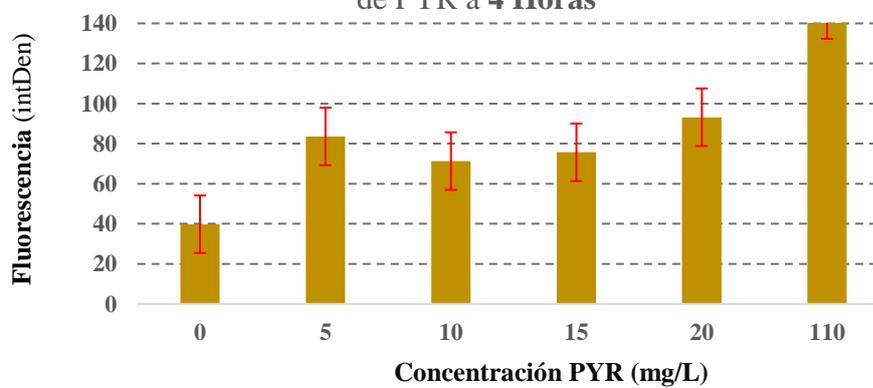
a- Respuesta fluorescente a concentraciones incrementales de PYR a **0 Horas**



b- Respuesta fluorescente a concentraciones incrementales de PYR a **2 Horas**



c- Respuesta fluorescente a concentraciones incrementales de PYR a **4 Horas**



d- Respuesta fluorescente a oncentraciones incrementales de PYR a **8 Horas**

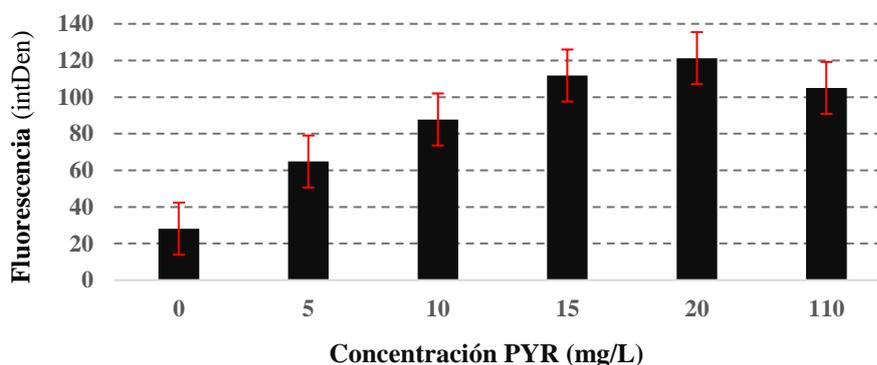


Figura 21. Respuesta fluorescente de S. cerevisiae STR3-GFP a concentraciones incrementales de pirimetanil desde tiempo inicial cero(a), 2(b), 4(c) y 8 horas de exposición (d).

Como se muestra en la gráfica (a Figura 21) de las cero horas, las diferencias en la fluorescencia son mínimas a concentraciones de 0, 5, 10, y 15 mg/L, pero una respuesta clara empieza a observarse en las concentraciones más elevadas de 20 y 110 mg/L, pudiendo interpretarse como que el PYR comienza a inducir el sistema reportero desde el tiempo inicial del experimento; ya para las dos horas (b) concentraciones de 5 mg/L en adelante ya muestran un incremento notable en la fluorescencia que superan la totalidad de registros anteriores. T4 (c) para las concentraciones más bajas, tiende a estabilizarse, pero a 110 mg/L se observa un aumento de la señal de GFP que alcanza el mayor registro con una intensidad de 146,7, lo que es consistente con el patrón de dosis-respuesta que se describió previamente. En T8 (d) las células expuestas a concentraciones intermedias y bajas empiezan a mostrar signos de adaptación o saturación del sistema de estrés, mientras que, la concentración más alta registra por primera vez un decaimiento de la señal de 146,7 a 105 de intensidad. Este decaimiento sugiere una respuesta biológica que podría estar relacionada con la fase de crecimiento de la levadura y su capacidad para mantener la respuesta al estrés después de 8 horas a concentraciones altas de pesticida (110 mg/L), una respuesta posiblemente vinculada con la entrada a la fase estacionaria o muerte celular, donde las células tienden a reducir su actividad metabólica conservando energía ante la limitación de recursos o como respuesta a un ambiente estresante debido a la acumulación de sustancias tóxicas, que en este caso puede considerarse al pirimetanil.

8.7 Registros fotográficos de fluorescencia

A continuación, se presenta uno de los diez registros fotográficos obtenidos mediante microscopía de fluorescencia para cada tratamiento. Las imágenes fueron capturadas utilizando el modo de luz transmitida de campo brillante (TL-BF) y el filtro GFP. La distribución presentada en las siguientes graficas destaca la presencia y la intensidad de la fluorescencia en la misma célula en dos modos diferentes: uno para detectar la luz transmitida y otro para capturar la fluorescencia emitida.

Los registros fotográficos inician por las concentraciones más bajas del pirimetanil a lo largo de cuatro tiempos de exposición. Las fotografías divididas en estos tres grupos ilustran la correlación entre la concentración y tiempo de exposición a pirimetanil con la intensidad de fluorescencia. Los tratamientos de 20 y 110 mg/L registran una fluorescencia más intensa, confirmando los datos cuantitativos.

8.7.1 Concentración de pirimetanil a 0 mg/L y 5mg/L

El grupo de imágenes de la figura 22 muestra los registros de fluorescencia promedio más bajos de todos los tratamientos, lo cual se refleja en los datos de la tabla 14. Al observar las fotos del control (0 mg/L), la fluorescencia inicial es mínima (11,45), con un leve incremento entre las 2 y 4 horas, hasta llegar a las 8 horas con un registro de 28,15. Los registros del grupo control pueden relacionarse con la fluorescencia basal, es decir, el nivel mínimo de fluorescencia expresado en ausencia del pirimetanil, que como ya se analizó previamente, podría estar relacionada con una actividad metabólica normal.

Este patrón es consistente en todos los grupos analizados, la fluorescencia del control tiende a incrementarse con el tiempo, pero siempre es menor a cualquier exposición del fungicida. Los registros del control son difícilmente visibles con el filtro GFP, contrastando notablemente con la fluorescencia claramente identificable en los otros tratamientos. En la concentración de 5 mg/L, también existe un incremento: a las 2 horas la fluorescencia es claramente observable con 108,32 que es el valor más alto, sin embargo, sigue siendo reconocible para las otras condiciones experimentales.

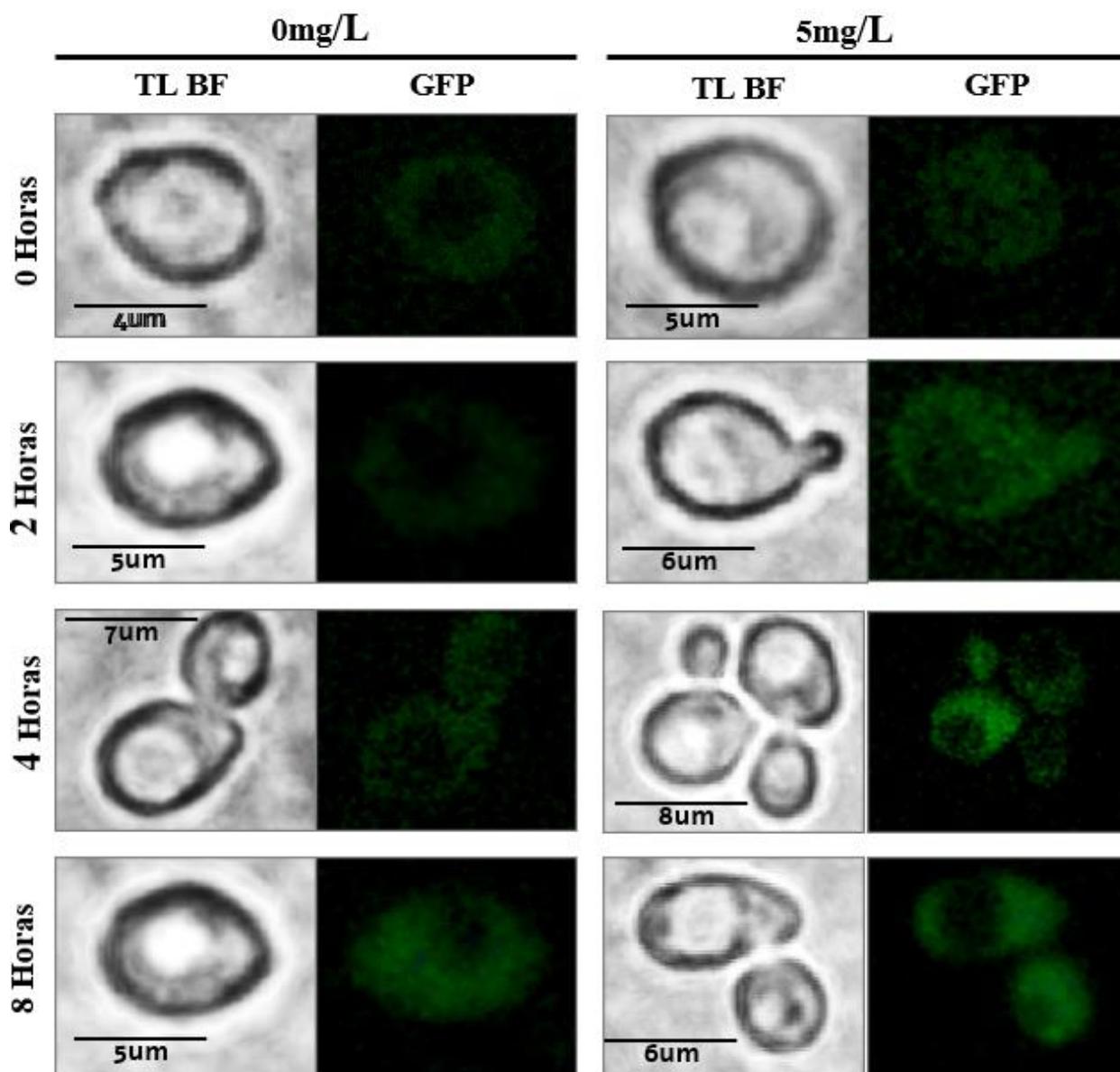


Figura 22. Registro fotográfico (TL-BF) Y GFP en las concentraciones de 0 y 5mg/L en 4 registros de tiempo.

8.7.2 Concentración de pirimetanil a 10 mg/L y 15mg/L

El grupo de imágenes de la figura 23 correspondiente a 10 y 15 mg/L, muestra una fluorescencia más intensa que el grupo anterior.

A 10 mg/L, se observa una intensidad de fluorescencia incrementada en razón del tiempo de 14,94 que da un aumento gradual hasta 87,6 a las 8 horas. Esto indica una activación sucesiva del promotor manteniendo una respuesta constante hasta el último registro. A 15 mg/L, la

tendencia es similar, con la fluorescencia alcanzando su máximo de 111,78 4 2 horas, destacando la sensibilidad del promotor a concentraciones moderadas de pirimetanil.

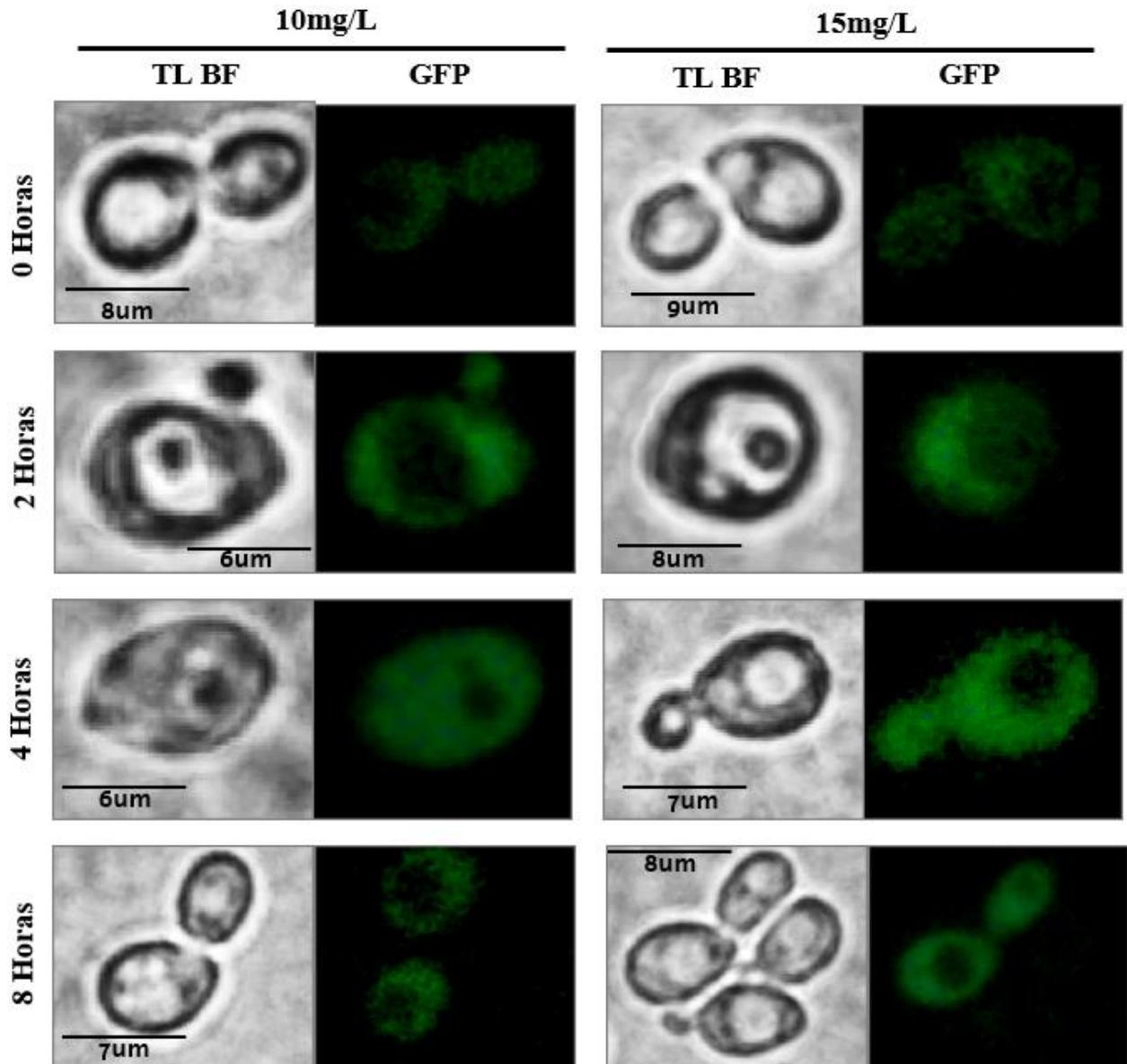


Figura 23. Registro fotográfico (TL-BF) Y GFP en las concentraciones de 10 y 15mg/L en 4 registros de tiempo.

8.7.3 Concentración de pirimetanil a 20 mg/L y 110mg/L

Este grupo (Figura 24) exhibe las intensidades de fluorescencia más altas de todo el experimento, manteniéndose al igual que en las anteriores condiciones, un incremento consistente con la concentración y el tiempo.

Inicialmente, a las 0 horas, la fluorescencia es baja en ambas concentraciones; sin embargo, a las 4 horas, ambas muestran un aumento significativo. A 20 mg/L, la intensidad de fluorescencia aumenta gradualmente desde 34,48 a las 0 horas hasta 121,24 a las 8 horas. En el grupo de 110 mg/L, se registra un valor máximo de 146,66 a las 4 horas, lo que sugiere una activación máxima del promotor.

Ello resalta nuevamente que la concentración de pirimetanil y el tiempo de exposición son factores críticos para la activación del promotor y la intensidad de la fluorescencia.

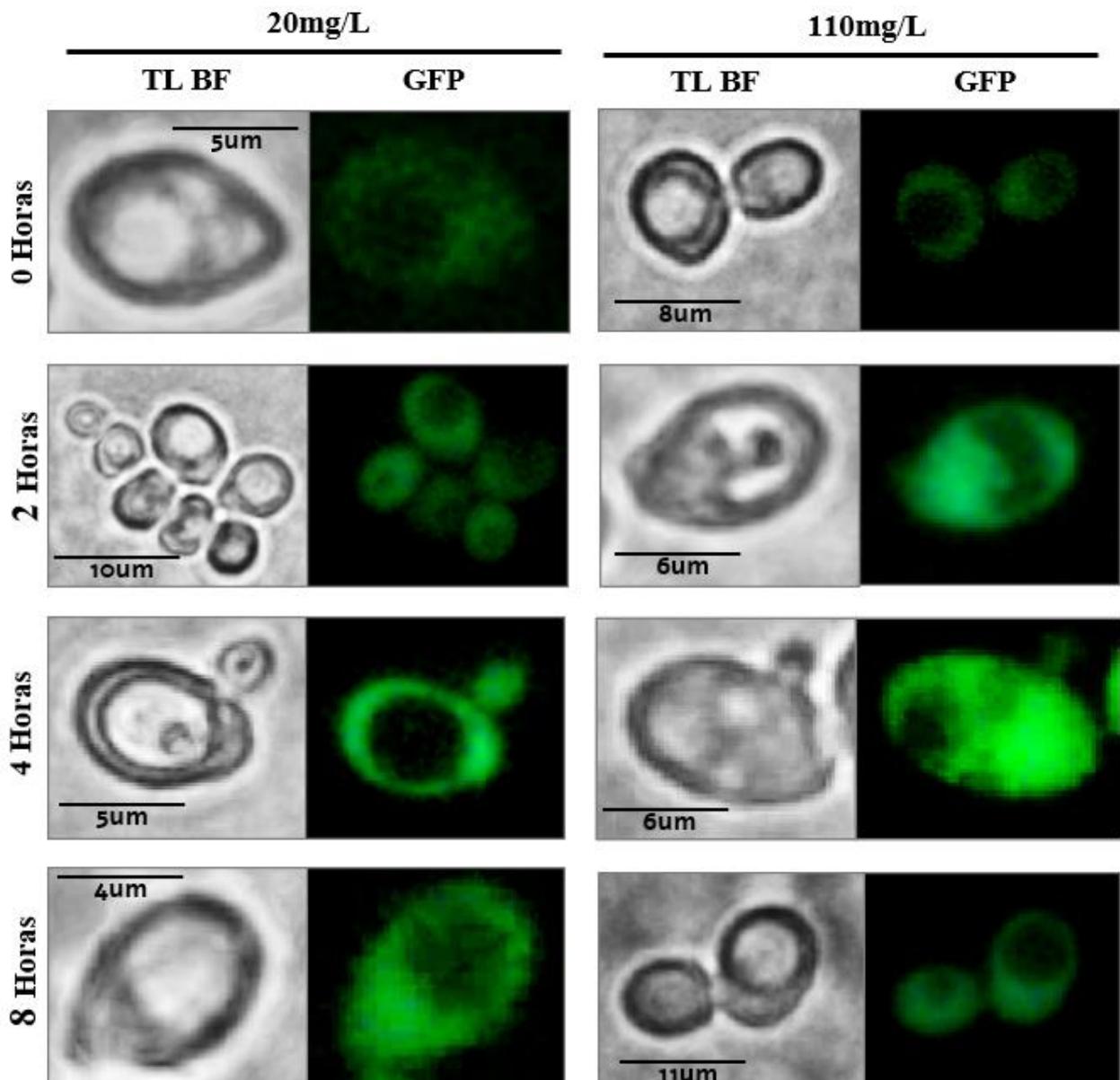


Figura 24. Registro fotográfico (TL-BF) Y GFP en las concentraciones de 20 y 110g/L en 4 registros de tiempo.

9 DISCUSIÓN

En Ecuador, al igual que en otros países con economías agroindustriales en desarrollo, el uso de fungicidas ha aumentado significativamente debido a la necesidad de mejorar la productividad agrícola y proteger los cultivos frente a patógenos (Tleuova et al., 2020). El Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAAE) y la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD) son las entidades responsables de establecer y hacer cumplir las normativas acerca de la regulación de fungicidas, estableciendo su clasificación, registro, comercialización y límites permisibles de uso, sin embargo, su supervisión presenta serias limitaciones, pues la dispersión geográfica de las zonas de cultivo y la limitada capacidad técnica de las autoridades dificultan la implementación de controles estrictos. El Pirimetanil se comercializa bajo diversas marcas y nombres en el mercado ecuatoriano, siendo ampliamente utilizado para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) y la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), dos plagas de gran relevancia en la producción de flores y frutas de exportación, como rosas y banano; y a pesar de su amplio uso, no existen datos oficiales que detallen las cantidades exactas aplicadas, ni guías específicas para su manejo en el contexto ecuatoriano, lo que subraya la necesidad de analizar los siguientes resultados que podrían ser de valiosa ayuda de monitorización y desarrollo de herramientas de control ambiental.

9.1 Análisis y validación del constructo pUG35 modificado

Proporcionar mediciones precisas de la actividad promotora es fundamental para la construcción predictiva y efectiva de sistemas genéticos (Shao et al., 2021). En este contexto la incorporación del gen reportero GFP en el vector pUG35 ha sido una estrategia ampliamente adoptada, ya que permite una cuantificación directa mediante una señal de la fluorescencia (Glingston et al., 2021). Esta combinación ha demostrado ser eficaz en numerosos estudios para medir la actividad de promotores en células vivas, proporcionando una metodología robusta para la caracterización de diversas interacciones fisiológicas (Kovacs et al., 2023). Biosensores que emplean un esquema basado en la adaptación de factores de transcripción específicos y secuencias promotoras que responden a determinados compuestos han sido previamente reportados y sus aplicaciones son muy diversas. Destaca el trabajo de (Dabirian et al., 2019c) que mediante la modificación de cinco promotores nativos y otros elementos regulatorios aportaron estrategias avanzadas que pueden

incorporarse al diseño de biosensores basados en levadura y que recalcan como la manipulación de elementos promotores puede aumentar la precisión y sensibilidad.

9.2 Curvas de crecimiento

9.2.1 Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* BY4742 "Wild type"

Los resultados coinciden con lo esperado, ya que las levaduras expuestas al pirimetanil mostraron una notable reducción en su crecimiento en comparación con el grupo no expuesto, validando un efecto tóxico del fungicida ya reportado en la literatura (Gil et al., 2015). El grupo control tuvo un crecimiento celular estándar, mostrando un desarrollo exponencial caracterizado por una duplicación constante en periodos regulares, lo que es indicativo de un metabolismo activo y normal (Olivares-Marin et al., 2018). Las tres curvas de crecimiento en el caso de la cepa BY 4742 no modificada, expuesta a 0 mg/L (control), 10 mg/L, 20 mg/L y 110 mg/L del fungicida y en varios registros de tiempo, muestran resultados consistentes con informes de literatura sobre la toxicidad del PYR en una cepa "Wild Type, donde se observan registros de absorbancias comparables a nuestros resultados, pero en una cepa BY 4741, ya que, los IC10, IC20 y IC50 de 10, 20 y 110 mg/L, respectivamente, demuestran una clara relación dosis-respuesta (Gil et al., 2014).

Incluso se registra similar efecto inhibitorio frente a otros fungicidas de similar modo de acción sistémica como el tebuconazol, donde los controles alcanzan una OD de alrededor de 3 para el control y una de alrededor de 2 para una concentración de 50mg/L (Mendes et al., 2024). El contraste con estos trabajos no solo es importante para analizar la levadura sin modificación alguna, sino que se toman destacable relevancia ya que también evalúan la respuesta transcriptómica que se analizará mas adelante.

El análisis de los registros de absorbancia obtenidos, muestran concordancia con reportes de literatura que concluyen que el factor concentración del fungicida tiene un impacto notable sobre los niveles de densidad óptica, destacando las concentraciones de 20 y 110 mg/L.

9.2.2 Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* BY 4742 modificada con el vector 35-PSTR3.

Las tres curvas de crecimiento de la cepa BY4742 pUG35 -PSTR3 al igual que en la cepa no modificada, destacan cómo el fungicida afecta al crecimiento de la levadura dependiendo de la concentración y el tiempo.

El hecho de que no existan estudios sobre cepas modificadas con este promotor y luego expuestas a pirimetanil, limita el análisis y comparación de resultados a lo observado en la cepa "Wild type". Sin embargo, los resultados obtenidos son consistentes con el patrón de inhibición dosis-dependiente, pero con variaciones importantes atribuibles a una expresión diferencial posiblemente inducida por el promotor STR3.

Desde los registros iniciales a 2 horas hasta las 6, las levaduras expuestas a 0 y 10 mg/L mostraron un leve aumento en la densidad óptica que carece de significancia estadística frente a las concentraciones de 20 y 110 mg/L, reiterando acerca del efecto tóxico del fungicida a concentraciones más altas.

Las alteraciones genéticas en levaduras o el uso de secuencias de promotoras modificadas, pueden tener efectos variados en el crecimiento y la expresión génica frente a condiciones ambientales específicas (Duveau et al., 2017) (Wang et al., 2018.), lo que podría explicar hasta cierto punto las diferencias observadas en los registros de absorbancia a concentraciones moderadas y altas, sugiriendo que el uso del promotor *STR3* podría estar involucrado en mecanismos de respuesta frente al fungicida, concordando con estudios previos acerca del efecto del Pirimetanil en el crecimiento y en la expresión génica global de *S. cerevisiae* (Gil et al., 2014).

9.3 Número de Células y Porcentaje de fluorescencia

A medida que aumenta la concentración de pirimetanil, también aumenta el porcentaje de células fluorescentes, esto sugiere que el pirimetanil podría estar induciendo una respuesta celular que se refleja en la fluorescencia, sin embargo, los resultados también destacan que en los tratamientos sin el fungicida se registra cierta fluorescencia, la intensidad de la misma será analizada más adelante, pero en este punto del análisis de resultados, este fenómeno podría atribuirse a una regulación basal de los promotores de estrés.

En situaciones normales, los promotores de respuesta a estrés, no se encuentran completamente inactivos, sino que mantienen un nivel basal de expresión permitiendo que

las células estén preparadas para responder rápidamente a estímulos externos. Peng et al., 2021, determinaron que los genes regulados por la respuesta a proteínas no plegadas (UPR), como ERO1 y DER1, están implicados en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico en levaduras y que mantienen un nivel basal de expresión en condiciones normales, lo cual constituye un mecanismo esencial para asegurar un entorno proteico óptimo, incluso en ausencia de estrés, lo cual es especialmente relevante en el contexto del incremento en la producción de proteínas heterólogas, que podría generarse durante la exposición al pirimetanil.

En relación al porcentaje de células fluorescentes, este varía según la concentración del fungicida y el tiempo de exposición, posiblemente a razón de que la expresión de genes bajo promotores inducidos por estrés tiende a ser heterogénea en poblaciones celulares y para este caso puede verse reflejada en que un porcentaje no mayor al 32 %, Rienzo et al., 2015, evaluaron dos promotores específicos, GAL1 y GRE2, y cómo responden a concentraciones variables de inductores relacionados a estímulos ambientales como componentes nutricionales y de estrés, concluyendo que no todas las células responden de la misma manera a un estímulo, presentando heterogeneidad en la expresión génica, pues la intensidad y el tiempo de la respuesta de promotores de estrés varían con la concentración del inductor y su dinámica temporal; otro punto a considerar es la resistencia adquirida al estrés, GRE2 presentó dicha resistencia y puede relacionarse a como las células que no expresan GFP después de largos periodos de exposición a PYR podrían estar mostrando un comportamiento similar de resistencia adquirida o adaptación. En el contexto de biosensores Williams et al., 2017, usaron el promotor PDR12 dirigiendo la expresión de GFP en respuesta a la producción de ácido para-hidroxibenzoico PHBA, enfatizando la importancia de la dinámica en la expresión génica y cómo la regulación puede ser modulada para obtener un rango dinámico de respuesta GFP, pues la variabilidad indica que algunas células pueden estar mejor adaptadas o más activas en respuesta al estrés.

9.4 Evaluación de la Intensidad de fluorescencia GFP

Los datos de la tabla 14 muestran un aumento progresivo en la intensidad de fluorescencia en función de la concentración y tiempo de exposición y a pesar de ciertas fluctuaciones, este patrón de incremento es consistente con la variación de las condiciones experimentales. Este efecto es particularmente pronunciado en las concentraciones de 20 mg/L y 110 mg/L,

que registran la mayor intensidad cuantificada y que relacionan nuevamente a las mas altas concertaciones con una respuesta intensificada de las células.

Al comparar estos resultados con hallazgos previos acerca de los efectos del pirimetanil en *S. cerevisiae* destaca lo ya descrito por Gil et al. (2024), quienes concluyeron que este fungicida tiene un impacto importante en la regulación de las vías metabólicas de la arginina, metionina y mecanismos de detoxificación. Se destaca la regulación positiva de *STR3* ante concentraciones de 20 y 110 mg/L, observándose un aumento en la actividad transcripcional de 4,1 y 12,7, respectivamente. Nuestro análisis respalda esta observación, ya que, frente a una concentración de 20 mg/L, el registro de intensidad de fluorescencia fue 2,54 veces más alto en comparación con el control y ante una concentración de 110 mg/L, la intensidad aumentó 2,76 veces. Claramente existen diferencias de magnitud, pero se puede observar un patrón en cuanto al aumento de la actividad de *STR3* en función de la concentración y tiempo de exposición a PYR, sugiriendo que este gen es un componente clave en la adaptación de la levadura a condiciones de estrés químico, esencialmente por su papel en la transulfuración de aminoácidos, vía metabólica que ha sido estudiada desde los años 90, con investigaciones como las de Cherest, Thomas y Surdin-Kerjan (1993), quienes describieron la biosíntesis de cisteína codificada por genes de la familia STR hasta trabajos mas recientemente como los de Xu, Jia y Tang (2018) que han explorado las aplicaciones de esta vía en la ingeniería metabólica demostrado que la suplementación con metionina exógena puede activar rutas metabólicas asociadas a la transulfuración, subrayando una vez más el papel esencial del *STR3* en estos procesos.

9.5 Respuesta fluorescente a concentraciones incrementales de PYR

El análisis de la fluorescencia revela que, al inicio del experimento (cero horas), las diferencias entre las concentraciones de 0 a 15 mg/L son mínimas, mientras que a concentraciones más altas (20 y 110 mg/L) comienza a observarse una respuesta clara, indicando la inducción del sistema reportero por el pirimetanil.

Esta respuesta aumenta alcanzando su mayor registro a partir de las 4 horas y ya para las 8 horas se observa un decaimiento en la fluorescencia en la concentración más alta, disminuyendo de 146,7 a 105 de intensidad.

Este posible decaimiento de la florescencia puede ser contrastado con los registros de Qie y colaboradores 2015, que concluyeron que ante ciertas condiciones prolongada de estrés la expresión de proteínas reporteras puede disminuir independientemente de la intensidad del

estímulo , este análisis se fundamenta en que, determinaron un cambio en la actividad transcripcional del regulador *SCH9* que influyó en la reducción de la expresión de proteínas del estrés oxidativo incluso antes de la fase estacionaria ayudando a la levadura a conservar energía (Qie et al., 2015). A pesar que *STR3* no está directamente relacionado con *SCH9*, su actividad podría verse reducida como parte de la disminución general del metabolismo de los aminoácidos que ocurre bajo la regulación de *SCH9*, dado que la célula prioriza la conservación de recursos y reduce determinada actividad transcripcional.

Otro análisis a tener en cuenta respecto a la intensidad a mayor concentración y tiempo de exposición, es la posible saturación de las rutas de detoxificación que quizá no se presente en las concentraciones menores; cuando la concentración de un tóxico supera la capacidad de estas vías, la levadura entra en un estado de saturación y daño celular tal como lo describe (Ravishankar et al., 2020) que expuso a *S. cerevisiae* a Glifosato determinando daños en el ADN, alteraciones en el ciclo celular y deterioro en la estructura de la pared celular.

El análisis fotográfico revela una concordancia con lo ya analizado cuantitativamente respecto a la intensidad de fluorescencia y con lo descrito en la literatura sobre una actividad transcripcional aumentada frente a las concentraciones más altas.

Nuestros resultados indican que el promedio más bajo de intensidad de fluorescencia se refleja en los tratamientos con menor tiempo y concentración, alcanzando un valor inicial mínimo de 11.45. En contraste, el valor máximo registrado fue de 146.7, correspondiente a la concentración de 110 mg/L en tiempos prolongados. Este comportamiento sigue un patrón dosis-respuesta, lo cual coincide con estudios previos sobre la actividad del gen *STR3* frente al pirimetanil.

Un importante ejemplo de cómo la expresión de *STR3* cambia en respuesta a diferentes condiciones metabólicas y ambientales es el estudio de Deshpande et al. (2017) que concluyó que este gen está estrechamente relacionado con rutas metabólicas adaptativas que permiten a *S. cerevisiae* responder a condiciones de estrés nutricional o ambiental, destacando su importancia como marcador de actividad celular frente a perturbaciones externas.

En estudios transcriptómicos más recientes, se ha evidenciado que la exposición de la levadura al pirimetanil induce cambios en la actividad transcriptómica del 28 % de su genoma, afectando a 777 genes con un aumento significativo de su actividad . Por ejemplo, Gil et al. (2014) demostraron que el gen *STR3* presenta un incremento en su actividad de 4.1 frente a concentraciones de 20 mg/L y una actividad de 12.7 en tratamientos de PYR con 110 mg/L, en comparación con el control.

De manera similar, los resultados de nuestro estudio confirman la existencia de un mecanismo de respuesta dosis-dependiente. Aunque utilizamos un enfoque basado en mediciones de fluorescencia los datos obtenidos reflejan un patrón comparable. Los valores de fluorescencia máxima fueron de 121.24 para 20 mg/L y 146.7 para 110 mg/L.

Si bien los resultados obtenidos en estudios de fluorescencia y análisis transcriptómicos no son directamente comparables debido a las diferencias metodológicas, ambos enfoques destacan la influencia del pirimetanil en la activación de rutas específicas vinculadas al estrés celular y la adaptación.

9 CONCLUSIONES

La construcción del plásmido modificado pUG35 mediante la inserción del promotor *STR3* fusionado al gen reportero GFP fue exitosa y corroborada mediante digestión enzimática y secuenciación, la comparación en la base de datos de promotores eucariotas y la expresión de GFP en *S. cerevisiae* confirmó su idoneidad para ensayos experimentales de exposición a pirimetanil.

Los resultados de las curvas de crecimiento de la cepa BY4742 “Wild type” expuesta a diferentes concentraciones del fungicida ejercen un efecto significativo en el crecimiento de la levadura, demostrado por un desarrollo óptimo en el control y una notable disminución en la densidad óptica a concentraciones altas y tiempo de exposición prolongados, remarcando la toxicidad del pirimetanil.

La evaluación del constructo *STR3*-GFP frente al fungicida, reveló distintos porcentajes de células que expresaron GFP, validando la funcionalidad del promotor *STR3* en un contexto de biosensor y determinando valores de fluorescencia asociados a una regulación basal que no superó el valor de 50 en intensidad para las diferentes condiciones experimentales.

La cuantificación de la fluorescencia revela un patrón de respuesta al estrés inducido, estableciéndose un aumento significativo de intensidad a medida que se incrementa la concentración y el tiempo de exposición, la expresión del gen reportero GFP se presenta desde el inicio del experimento y en cada tratamiento se diferencia claramente del control. El sistema refleja una sensibilidad destacable, la fluorescencia puede diferenciarse desde la concentración mínima, sin embargo, es particularmente intensa para las concentraciones de 20 mg/L y 110 mg/L. Y al comparar los incrementos porcentuales de fluorescencia en cada intervalo, se puede concluir que el intervalo de 2 a 4 horas podría ser el más sensible.

La construcción de un biosensor basado en el promotor *STR3* fusionado a un reportero GFP es viable y significativa, en condiciones experimentales ha demostrado funcionalidad y sensibilidad en la detección de PYR y podría convertirse en una herramienta prometedora de monitorización para otros pesticidas usados en la región.

10 REFERENCIAS

- Adeniran, A., Sherer, M., & Tyo, K. E. J. (2015). Yeast-based biosensors: Design and applications. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 15, Issue 1). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12203>
- Aleksić, M., Stanisavljević, D., Smiljković, M., Vasiljević, P., Stevanović, M., Soković, M., & Stojković, D. (2019a). Pyrimethanil: Between efficient fungicide against *Aspergillus* rot on cherry tomato and cytotoxic agent on human cell lines. *Annals of Applied Biology*, 175(2), 228–235. <https://doi.org/10.1111/aab.12532>
- Aleksić, M., Stanisavljević, D., Smiljković, M., Vasiljević, P., Stevanović, M., Soković, M., & Stojković, D. (2019b). Pyrimethanil: Between efficient fungicide against *Aspergillus* rot on cherry tomato and cytotoxic agent on human cell lines. *Annals of Applied Biology*, 175(2), 228–235. <https://doi.org/10.1111/aab.12532>
- Araújo, C. V. M., Shinn, C., Müller, R., Moreira-Santos, M., Espíndola, E. L. G., & Ribeiro, R. (2015). The Ecotoxicity of Pyrimethanil for Aquatic Biota. In *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*. InTech. <https://doi.org/10.5772/60708>
- Aysha, M. S., Suryanarayanan, T. S., Nataraja, K. N., Prasad, S. R., & Shaanker, R. U. (2021). Seed Treatment With Systemic Fungicides: Time for Review. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.654512>
- Baibakova, E. V., Nefedjeva, E. E., Suska-Malawska, M., Wilk, M., Sevriukova, G. A., & Zheltobriukhov, V. F. (2019). Modern Fungicides: Mechanisms of Action, Fungal Resistance and Phytotoxic Effects. *Annual Research & Review in Biology*, 1–16.
<https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v32i330083>
- Baldini, F., & Minunni, M. (2019). New developments in biosensors. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 411, Issue 29, pp. 7605–7606). Springer.
<https://doi.org/10.1007/s00216-019-02232-z>
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2017). Microbial contribution to Wine aroma and its intended use for Wine quality improvement. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 2). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/molecules22020189>
- Bernabò, I., Guardia, A., MacIrella, R., Tripepi, S., & Brunelli, E. (2017). Chronic exposures to fungicide pyrimethanil: Multi-organ effects on Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07367-6>
- Biermann, A. R., & Hogan, D. A. (2022). Transcriptional Response of *Candida auris* to the Mrr1 Inducers Methylglyoxal and Benomyl. *MSphere*, 7(3).
<https://doi.org/10.1128/msphere.00124-22>
- Boniewska-Bernacka, E., Wysocki, R., Grochowalska, R., Machnicka, B., Ułaszewski, S., & Lachowicz, T. (2006). *The YJL185C, YLR376C and YJR129C genes of Saccharomyces cerevisiae are probably involved in regulation of the glyoxylate cycle*. www.actabp.pl
- Bovee, T. F. H., Helsdingen, R. J. R., Koks, P. D., Kuiper, H. A., Hoogenboom, R. L. A. P., & Keijer, J. (2004). Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein. *Gene*, 325(1–2), 187–200.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.10.015>

- Braconi, D., Bernardini, G., Fiorani, M., Azzolini, C., Marzocchi, B., Proietti, F., Collodel, G., & Santucci, A. (2010). Oxidative damage induced by herbicides is mediated by thiol oxidation and hydroperoxides production. *Free Radical Research*, *44*(8), 891–906. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.489111>
- Braconi, D., Bernardini, G., Possenti, S., Laschi, M., Arena, S., Scaloni, A., Geminiani, M., Sotgiu, M., & Santucci, A. (2009). Proteomics and redox-proteomics of the effects of herbicides on a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Proteome Research*, *8*(1), 256–267. <https://doi.org/10.1021/pr800372q>
- Braconi, D., Bernardini, G., & Santucci, A. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. In *Journal of Proteomics* (Vol. 137, pp. 19–34). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.001>
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Melis, M., Pirisi, F. M., Minelli, E. V, Cabitza, F., & Cubeddu, M. (1997). *Fate of Some New Fungicides (Cyprodinil, Fludioxonil, Pyrimethanil, and Tebuconazole) from Vine to Wine*.
- Chalklen, T., Jing, Q., & Kar-Narayan, S. (2020). Biosensors based on mechanical and electrical detection techniques. *Sensors (Switzerland)*, *20*(19), 26–37. <https://doi.org/10.3390/s20195605>
- Chawla, B. (2017). *STUDIES ON THE REGULATION OF STR3 IN Saccharomyces cerevisiae A dissertation submitted for the partial fulfilment of BS-MS dual degree in Science*.
- Chen, Z., Dong, X., Liu, C., Wang, S., Dong, S., & Huang, Q. (2023). Rapid detection of residual chlorpyrifos and pyrimethanil on fruit surface by surface-enhanced Raman spectroscopy integrated with deep learning approach. *Scientific Reports*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45954-y>
- Chia, P. Z. C., & Gleeson, P. A. (2013). Imaging and quantitation techniques for tracking cargo along endosome-to-Golgi transport pathways. In *Cells* (Vol. 2, Issue 1, pp. 105–123). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells2010105>
- Coleman, M. D., O’Neil, J. D., Woehrling, E. K., Ndunge, O. B. A., Hill, E. J., Menache, A., & Reiss, C. J. (2012). A preliminary investigation into the impact of a pesticide combination on human neuronal and glial cell lines in vitro. *PLoS ONE*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042768>
- Cordente, A. G., Borneman, A. R., Bartel, C., Capone, D., Solomon, M., Roach, M., & Curtin, C. D. (2019). Inactivating mutations in *Irc7p* are common in wine yeasts, attenuating carbonsulfur β -lyase activity and volatile sulfur compound production. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(6). <https://doi.org/10.1128/AEM.02684-18>
- Cottier, V., Barberis, A., & Lüthi, U. (2006). Novel yeast cell-based assay to screen for inhibitors of human cytomegalovirus protease in a high-throughput format. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(2), 565–571. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.565-571.2006>
- Dabirian, Y., Li, X., Chen, Y., David, F., Nielsen, J., & Siewers, V. (2019a). Expanding the Dynamic Range of a Transcription Factor-Based Biosensor in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, *8*(9), 1968–1975. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00144>
- Dabirian, Y., Li, X., Chen, Y., David, F., Nielsen, J., & Siewers, V. (2019b). Expanding the Dynamic Range of a Transcription Factor-Based Biosensor in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, *8*(9), 1968–1975. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00144>

- Dabirian, Y., Li, X., Chen, Y., David, F., Nielsen, J., & Siewers, V. (2019c). Expanding the Dynamic Range of a Transcription Factor-Based Biosensor in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 8(9), 1968–1975. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00144>
- de Bont, L., Donnay, N., Couturier, J., & Rouhier, N. (2022). Redox regulation of enzymes involved in sulfate assimilation and in the synthesis of sulfur-containing amino acids and glutathione in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.958490>
- Denton, J. A., & Gokhale, C. S. (2020). Synthetic Symbiosis under Environmental Disturbances. *MSystems*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/msystems.00187-20>
- Deshpande, A. A., Bhatia, M., Laxman, S., & Bachhawat, A. K. (2017). Thiol trapping and metabolic redistribution of sulfur metabolites enable cells to overcome cysteine overload. *Microbial Cell*, 4(4), 112–126. <https://doi.org/10.15698/mic2017.04.567>
- Dhiman, S. (2019). *Studies on the regulatory domain of 5, 10-Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR)*.
- Duveau, F., Toubiana, W., & Wittkopp, P. J. (2017). *Fitness effects of cis-regulatory variants in the Saccharomyces cerevisiae TDH3 promoter*.
- Eastbrook, C. L., Morales Maqueda, M., Vagg, C., Idomeh, J., Nasif-Whitestone, T. A., Lawrence, P., Bronowska, A. K., Bothwell, J. H., Sallach, B. J., Redfern, J., & Caldwell, G. S. (2022). *Determining the toxicity and potential for environmental transport of pyridine using the brown crab Cancer pagurus (L.)*. <https://doi.org/10.1101/2022.11.17.516169>
- Eberlin, A. R., & Frampton, C. S. (2017). A metastable polymorphic form of the antifungal anilinopyrimidine active pyrimethanil-Eberlin Alex R. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 73, 886–889. <https://doi.org/10.1107/S2056989017007563>
- Epa, U., & of Pesticide Programs, O. (2004). *U.S. EPA, Pesticide Product Label, PYRIMETHANIL TECHNICAL FUNGICIDE, 08/13/2004*
- Faniband, M., Ekman, E., Littorin, M., Maxe, M., Larsson, E., & Lindh, C. H. (2019a). Biomarkers of exposure to pyrimethanil after controlled human experiments. *Journal of Analytical Toxicology*, 43(4), 277–283. <https://doi.org/10.1093/jat/bky091>
- Faniband, M., Ekman, E., Littorin, M., Maxe, M., Larsson, E., & Lindh, C. H. (2019b). Biomarkers of exposure to pyrimethanil after controlled human experiments. *Journal of Analytical Toxicology*, 43(4), 277–283. <https://doi.org/10.1093/jat/bky091>
- Fernández-Acero, T., Rodríguez-Escudero, I., Vicente, F., Monteiro, M. C., Tormo, J. R., Cantizani, J., Molina, M., & Cid, V. J. (2012). A yeast-based in vivo bioassay to screen for class i phosphatidylinositol 3-kinase specific inhibitors. *Journal of Biomolecular Screening*, 17(8), 1018–1029. <https://doi.org/10.1177/1087057112450051>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). Pesticides use and trade 1990–2022. FAO. Recuperado de <https://www.fao.org/statistics/highlights-archive/highlights-detail/pesticides-use-and-trade-1990-2022/en>
- Gai, Y., Li, L., Ma, H., Riely, B. K., Liu, B., & Li, H. (2021). Critical Role of MetR/MetB/MetC/MetX in Cysteine and Methionine Metabolism, Fungal Development, and Virulence of *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(4), 1–24. <https://doi.org/10.1128/AEM.01911-20>

- García, M. A., Oliva, J., Barba, A., Cámara, M. A., Pardo, F., & Díaz-Plaza, E. M. (2004). Effect of Fungicide Residues on the Aromatic Composition of White Wine Inoculated with Three *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1241–1247. <https://doi.org/10.1021/jf030546f>
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., ... Johnston, M. (2002). *Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome*. <http://www.kegg.com>
- 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>
- Gil, F. N., Moreira-Santos, M., Chelinho, S., Pereira, C., Feliciano, J. R., Leitão, J. H., Sousa, J. P., Ribeiro, R., & Viegas, C. A. (2015). Suitability of a *Saccharomyces cerevisiae*-based assay to assess the toxicity of pyrimethanil sprayed soils via surface runoff: Comparison with standard aquatic and soil toxicity assays. *Science of the Total Environment*, 505, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.094>
- Glingston, S., Rajpoot, J., Deori, N. M., Deb, R., Kumar, S., & Nagotu, S. (2021). Characterization of nucleocapsid and matrix proteins of Newcastle disease virus in yeast. *3 Biotech*, 11(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02624-4>
- Gu, C., Kong, X., Liu, X., Gai, P., & Li, F. (2019). Enzymatic Biofuel-Cell-Based Self-Powered Biosensor Integrated with DNA Amplification Strategy for Ultrasensitive Detection of Single-Nucleotide Polymorphism. *Analytical Chemistry*, 91(13), 8697–8704. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02510>
- Gu, X., Orozco, J. M., Saxton, R. A., Condon, K. J., Liu, G. Y., Krawczyk, P. A., Scaria, S. M., Harper, J. W., Gygi, S. P., & Sabatini, D. M. (2017). *NUTRIENT SENSING SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway*. <https://www.science.org>
- Hassani, S., Momtaz, S., Vakhshiteh, F., Maghsoudi, A. S., Ganjali, M. R., Norouzi, P., & Abdollahi, M. (2017). Biosensors and their applications in detection of organophosphorus pesticides in the environment. In *Archives of Toxicology* (Vol. 91, Issue 1, pp. 109–130). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1875-8>
- Hayakawa, K., Kajihata, S., Matsuda, F., & Shimizu, H. (2015). ¹³C-metabolic flux analysis in S-adenosyl-l-methionine production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(5), 532–538. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.010>
- Hayashi, T., Teruya, T., Chaleckis, R., Morigasaki, S., & Yanagida, M. (2018). S-Adenosylmethionine Synthetase Is Required for Cell Growth, Maintenance of G0 Phase, and Termination of Quiescence in Fission Yeast. *IScience*, 5, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.06.011>
- Herrero-Hernández, E., Pose-Juan, E., Sánchez-Martín, M. J., Andrades, M. S., & Rodríguez-Cruz, M. S. (2016). Intra-annual trends of fungicide residues in waters from vineyard areas in La Rioja region of northern Spain. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(22), 22924–22936. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7497-0>
- Hippe, L., Svirskis, Š., Murovska, M., & Kalis, M. (2018). Optimisation of Widefield Fluorescence Fret System for Studying Separate Molecule Interactions. *Proceedings of the Latvian*

Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences, 72(4), 252–258.
<https://doi.org/10.2478/prolas-2018-0065>

- Hollis, R. P., Killham, K., & Glover, L. A. (2000). Design and Application of a Biosensor for Monitoring Toxicity of Compounds to Eukaryotes. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 66, Issue 4).
- Hu, Z. (2020). What socio-economic and political factors lead to global pesticide dependence? A critical review from a social science perspective. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 21, pp. 1–22). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17218119>
- IEEE Malaysia Section. Power Electronics, I. E. & I. A. J. Chapter., & IEEE Malaysia Section. (2012). *CHUSER 2012 : 2012 IEEE Colloquium on Humanities, Science & Engineering Research : Magellan Sutera Resort, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia : December 3-4, 2012*. [IEEE].
- Johnson, Z. M., Wang, Y., Sutter, B. M., & Tu, B. P. (n.d.). *Evidence for a hydrogen sulfide-sensing E3 ligase in yeast*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.06.425657>
- Kalhan, S. C., Edmison, J., Marczewski, S., Dasarathy, S., Gruca, L. L., Bennett, C., Duenas, C., & Lopez, R. (2011). Methionine and protein metabolism in non-alcoholic steatohepatitis: Evidence for lower rate of transmethylation of methionine. *Clinical Science*, 121(4), 179–189.
<https://doi.org/10.1042/CS20110060>
- 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>
- Kankipati, H. N., Rubio-Teixeira, M., Castermans, D., Diallinas, G., & Thevelein, J. M. (2015). Sul1 and Sul2 sulfate transceptors signal to protein kinase A upon exit of sulfur starvation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(16), 10430–10446.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.629022>
- Kaskova, Z. M., Tsarkova, A. S., & Yampolsky, I. V. (2016). 1001 lights: Luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 45, Issue 21, pp. 6048–6077). Royal Society of Chemistry.
<https://doi.org/10.1039/c6cs00296j>
- Kitagawa, E., Takahashi, J., Momose, Y., & Iwahashi, H. (2002). Effects of the pesticide thiuram: Genome-wide screening of indicator genes by yeast DNA microarray. *Environmental Science and Technology*, 36(18), 3908–3915. <https://doi.org/10.1021/es015705v>
- Kovacs, M., Geltinger, F., Schartel, L., Pöschl, S., Briza, P., Paschinger, M., Boros, K., Felder, T. K., Wimmer, H., Duschl, J., & Rinnerthaler, M. (2023). Ola1p trafficking indicates an interaction network between mitochondria, lipid droplets, and stress granules in times of stress. *Journal of Lipid Research*, 64(12). <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100473>
- Kuplińska, A., & Rząd, K. (2021). Molecular targets for antifungals in amino acid and protein biosynthetic pathways. In *Amino Acids* (Vol. 53, Issue 7, pp. 961–991). Springer.
<https://doi.org/10.1007/s00726-021-03007-6>
- Lengger, B., & Jensen, M. K. (2020). Engineering G protein-coupled receptor signalling in yeast for biotechnological and medical purposes. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 20, Issue 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz087>

- Liljedahl, E. R., Johanson, G., de Paula, H. K., Faniband, M., Assarsson, E., Littorin, M., Engfeldt, M., Lidén, C., Julander, A., Wahlberg, K., Lindh, C., & Broberg, K. (2021). Filaggrin polymorphisms and the uptake of chemicals through the skin—a human experimental study. *Environmental Health Perspectives*, *129*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1289/EHP7310>
- Lind, A. C., David, F., & Siewers, V. (2024). Evaluation and comparison of colorimetric outputs for yeast-based biosensors in laboratory and point-of-use settings. *FEMS Microbiology Letters*, *371*. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnae034>
- Lloyd, A. W., Percival, D., Langille, M. G. I., & Yurgel, S. N. (2023). Changes to Soil Microbiome Resulting from Synergetic Effects of Fungistatic Compounds Pyrimethanil and Fluopyram in Lowbush Blueberry Agriculture, with Nine Fungicide Products Tested. *Microorganisms*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020410>
- Maddila, S., Gorle, S., Seshadri, N., Lavanya, P., & Jonnalagadda, S. B. (2016). Synthesis, antibacterial and antifungal activity of novel benzothiazole pyrimidine derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, *9*(5), 681–687. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.003>
- Martin-Yken, H. (2020). Yeast-based biosensors: Current applications and new developments. In *Biosensors* (Vol. 10, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/BIOS10050051>
- Martin-Yken, H., Gironde, C., Derick, S., Darius, H. T., Furger, C., Laurent, D., & Chinain, M. (2018). Ciguatoxins activate the Calcineurin signalling pathway in Yeasts: Potential for development of an alternative detection tool? *Environmental Research*, *162*, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.12.022>
- Martzoukou, O., Glekas, P., Avgeris, M., Mamma, D., & Scorilas, A. (2022). *The interplay between sulfur metabolism and desulfurization profile in Rhodococcus: Unraveling the role of the transsulfuration pathway*. <https://doi.org/10.1101/2022.02.14.480474>
- Masson, P. H., Takahashi, T., & Angelini, R. (2017). Editorial: Molecular mechanisms underlying polyamine functions in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00014>
- Mclaughlin, J. E., Anwar Bin-Umer, M., Tortora, A., Mendez, N., McCormick, S., & Tumer, N. E. (n.d.). *A genome-wide screen in Saccharomyces cerevisiae reveals a critical role for the mitochondria in the toxicity of a trichothecene mycotoxin*. www.yeastgenome.org
- 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>
- Meng, Y., Zhong, K., Xiao, J., Huang, Y., Wei, Y., Tang, L., Chen, S., Wu, J., Ma, J., Cao, Z., Liao, X., & Lu, H. (2020a). Exposure to pyrimethanil induces developmental toxicity and cardiotoxicity in zebrafish. *Chemosphere*, *255*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126889>
- Meng, Y., Zhong, K., Xiao, J., Huang, Y., Wei, Y., Tang, L., Chen, S., Wu, J., Ma, J., Cao, Z., Liao, X., & Lu, H. (2020b). Exposure to pyrimethanil induces developmental toxicity and cardiotoxicity in zebrafish. *Chemosphere*, *255*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126889>
- Minuzzo, M., Bizzotto, E., & Lettieri, T. (2006). *Gene Expression Profiling of the Budding Yeast S. cerevisiae Upon Exposure to the Pesticide Atrazine*. <http://ies.jrc.cec.eu.inthttp://www.jrc.cec.eu.inthttp://europa.eu.int>

- Mitterbauer, R., Weindorfer, H., Safaie, N., Krska, R., Lemmens, M., Ruckenbauer, P., Kuchler, K., & Adam, G. (2003). A sensitive and inexpensive yeast bioassay for the mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(2), 805–811. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.805-811.2003>
- Miyake, R., Ling, H., Foo, J. L., Fugono, N., & Chang, M. W. (2022). Transporter-Driven Engineering of a Genetic Biosensor for the Detection and Production of Short-Branched Chain Fatty Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.838732>
- Mosquera-Vivas, C. S., Celis-Ossa, R. E., González-Murillo, C. A., Obregón-Neira, N., Martínez-Cordón, M. J., Guerrero-Dallos, J. A., & García-Santos, G. (2024). Empirical model to assess leaching of pesticides in soil under a steady-state flow and tropical conditions. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *21*(2), 1301–1320. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-05038-w>
- Müller, R., Shinn, C., Waldvogel, A. M., Oehlmann, J., Ribeiro, R., & Moreira-Santos, M. (2019a). Long-term effects of the fungicide pyrimethanil on aquatic primary producers in macrophyte-dominated outdoor mesocosms in two European ecoregions. *Science of the Total Environment*, *665*, 982–994. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.050>
- Müller, R., Shinn, C., Waldvogel, A. M., Oehlmann, J., Ribeiro, R., & Moreira-Santos, M. (2019b). Long-term effects of the fungicide pyrimethanil on aquatic primary producers in macrophyte-dominated outdoor mesocosms in two European ecoregions. *Science of the Total Environment*, *665*, 982–994. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.050>
- Müller, R., Shinn, C., Waldvogel, A. M., Oehlmann, J., Ribeiro, R., & Moreira-Santos, M. (2019c). Long-term effects of the fungicide pyrimethanil on aquatic primary producers in macrophyte-dominated outdoor mesocosms in two European ecoregions. *Science of the Total Environment*, *665*, 982–994. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.050>
- Munzar, J. D., Ng, A., & Juncker, D. (2019). Duplexed aptamers: History, design, theory, and application to biosensing. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 48, Issue 5, pp. 1390–1419). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8cs00880a>
- Ng, E. L., Bandow, C., Proença, D. N., Santos, S., Guilherme, R., Morais, P. V., Römbke, J., & Sousa, J. P. (2014). Does altered rainfall regime change pesticide effects in soil? A terrestrial model ecosystem study from Mediterranean Portugal on the effects of pyrimethanil to soil microbial communities under extremes in rainfall. *Applied Soil Ecology*, *84*, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.006>
- Nguyen, H. B., Terwilliger, T. C., & Waldo, G. S. (2021). Engineering an efficient and bright split *Corynactis californica* green fluorescent protein. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98149-8>
- North, M., & Vulpe, C. D. (2010). Functional toxicogenomics: Mechanism-centered toxicology. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 11, Issue 12, pp. 4796–4813). <https://doi.org/10.3390/ijms11124796>
- Ogawa, M., Yamaji, R., Mitani, T., Murata, Y., Nakao, M., Harada, N., Nakano, Y., & Inui, H. (2010). A yeast bioassay for androgenic and anti-androgenic compounds based on the NH₂- and COOH-terminal interaction of androgen receptor. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *74*(9), 1965–1968. <https://doi.org/10.1271/bbb.100323>

- Olivares-Marin, I. K., González-Hernández, J. C., Regalado-Gonzalez, C., & Madrigal-Perez, L. A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* exponential growth kinetics in batch culture to analyze respiratory and fermentative metabolism. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(139). <https://doi.org/10.3791/58192>
- Ostrov, N., Jimenez, M., Billerbeck, S., Brisbois, J., Matragrano, J., Ager, A., & Cornish, V. W. (2017). *HEALTH AND MEDICINE A modular yeast biosensor for low-cost point-of-care pathogen detection*.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. In *AIMS Microbiology* (Vol. 6, Issue 1, pp. 1–31). AIMS Press. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Parveen, M., Momose, Y., Kitagawa, E., Kurita, S., Kodama, O., & Iwahashi, H. (2003). Bioassay of Pesticide Lindane Using Yeast-DNA Microarray Technology. In *Chem-Bio Informatics Journal* (Vol. 3, Issue 1). <http://www.cbi.or.jp>
- Patel, A., Asik, D., Spornyak, J. A., Cullen, P. J., & Morrow, J. R. (2019). MRI and fluorescence studies of *Saccharomyces cerevisiae* loaded with a bimodal Fe(III) T1 contrast agent. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110832>
- Peng, K., Kroukamp, H., Pretorius, I. S., & Paulsen, I. T. (2021). Yeast Synthetic Minimal Biosensors for Evaluating Protein Production. *ACS Synthetic Biology*, 10(7), 1640–1650. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00633>
- Pereira, P. R., Freitas, C. S., & Paschoalin, V. M. F. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* biomass as a source of next-generation food preservatives: Evaluating potential proteins as a source of antimicrobial peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4450–4479. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12798>
- Peter, S., Oven-Krockhaus, S. Zur, Veerabagu, M., Rodado, V. M., Berendzen, K. W., Meixner, A. J., Harter, K., & Schleifenbaum, F. E. (2017). Chimeric Autofluorescent Proteins as Photophysical Model System for Multicolor Bimolecular Fluorescence Complementation. *Journal of Physical Chemistry B*, 121(11), 2407–2419. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11623>
- Pham, H. T. M., Giersberg, M., Gehrmann, L., Hettwer, K., Tuerk, J., Uhlig, S., Hanke, G., Weisswange, P., Simon, K., Baronian, K., & Kunze, G. (2015). The determination of pharmaceuticals in wastewater using a recombinant *Arxula adenivorans* whole cell biosensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 211, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.107>
- Poloni, V., Magnoli, A., Fochesato, A., Cristofolini, A., Caverzan, M., Merkis, C., Montenegro, M., & Cavaglieri, L. (2020). A *Saccharomyces cerevisiae* RC016-based feed additive reduces liver toxicity, residual aflatoxin B1 levels and positively influences intestinal morphology in broiler chickens fed chronic aflatoxin B1-contaminated diets. *Animal Nutrition*, 6(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.11.006>
- Pu, J., Zinkus-Boltz, J., & Dickinson, B. C. (2017). Evolution of a split RNA polymerase as a versatile biosensor platform. *Nature Chemical Biology*, 13(4), 432–438. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2299>
- Qie, B., Lyu, Z., Lyu, L., Liu, J., Gao, X., Liu, Y., Duan, W., Zhang, N., Du, L., & Liu, K. (2015). Sch9 regulates intracellular protein ubiquitination by controlling stress responses. *Redox Biology*, 5, 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.002>

- Qiu, C., Chen, X., Rexida, R., Shen, Y., Qi, Q., Bao, X., & Hou, J. (2020). Engineering transcription factor-based biosensors for repressive regulation through transcriptional deactivation design in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01405-1>
- Ravishankar, A., Pupo, A., & Gallagher, J. E. G. (2020). Resistance mechanisms of *saccharomyces cerevisiae* to commercial formulations of glyphosate involve DNA damage repair, the cell cycle, and the cell wall structure. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *10*(6), 2043–2056. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401183>
- Ren, L., Zhao, X. jun, Shi, X. jing, Guo, P. yi, & Han, J. cai. (2017). Pyrimethanil sensitivity and fitness in *Botrytis cinerea* populations from Shanxi Province, China. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *124*(2), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0073-0>
- Richter, I., & Fidler, A. E. (2015). Detection of marine microalgal biotoxins using bioassays based on functional expression of tunicate xenobiotic receptors in yeast. *Toxicon*, *95*, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.12.011>
- Rienzo, A., Poveda-Huertes, D., Aydin, S., Buchler, N. E., Pascual-Ahuir, A., & Proft, M. (2015). Different Mechanisms Confer Gradual Control and Memory at Nutrient- and Stress-Regulated Genes in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(21), 3669–3683. <https://doi.org/10.1128/mcb.00729-15>
- Rosslenbroich, H.-J., Rosslenbroich, H.-J., & Stuebler, D. (n.d.). *Botrytis cinerea * history of chemical control and novel fungicides for its management*.
- Sagatova, A. A., Keniya, M. V., Wilson, R. K., Monk, B. C., & Tyndall, J. D. A. (2015). Structural insights into binding of the antifungal drug fluconazole to *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14 α -demethylase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(8), 4982–4989. <https://doi.org/10.1128/AAC.00925-15>
- Sambrani, R., Abdolalizadeh, J., Kohan, L., & Jafari, B. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* inhibits growth and metastasis and stimulates apoptosis in HT-29 colorectal cancer cell line. *Comparative Clinical Pathology*, *28*(4), 985–995. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2855-6>
- Samokhvalov, A. V., Safenkova, I. V., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2018). The registration of aptamer–ligand (ochratoxin A) interactions based on ligand fluorescence changes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *505*(2), 536–541. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.109>
- Sayuk, O., Plotnytska, N., Troyachenko, R., & Ovezmyradova, O. (2022). EFFECT OF FUNGICIDES ON MYCOSIS PROGRESSION AND POTATO YIELDS. *Agraarteadus*, *33*(1), 139–145. <https://doi.org/10.15159/jas.22.16>
- Scott, J., Sueiro-Olivares, M., Thornton, B. P., Owens, R. A., Muhamadali, H., Fortune-Grant, R., Thomson, D., Thomas, R., Hollywood, K., Doyle, S., Goodacre, R., Taberner, L., Bignell, E., & Amich, J. (2020). Targeting methionine synthase in a fungal pathogen causes a metabolic imbalance that impacts cell energetics, growth, and virulence. *MBio*, *11*(5), 1–23. <https://doi.org/10.1128/mBio.01985-20>
- Seeland, A., Oehlmann, J., & Müller, R. (2012). Aquatic ecotoxicity of the fungicide pyrimethanil: Effect profile under optimal and thermal stress conditions. *Environmental Pollution*, *168*, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.020>

- Shao, B., Rammohan, J., Anderson, D. A., Alperovich, N., Ross, D., & Voigt, C. A. (2021). Single-cell measurement of plasmid copy number and promoter activity. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21734-y>
- Shao, W., Zhao, Y., & Ma, Z. (2021). Advances in understanding fungicide resistance in botrytis cinerea in China. *Phytopathology*, *111*(3), 455–463. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA>
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. In *Methods Enzymol* (Vol. 350). http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/StartedYeast.html
- Shinn, C., Delello-Schneider, D., Mendes, L. B., Sanchez, A. L., Müller, R., Espíndola, E. L. G., & Araújo, C. V. M. (2015a). Immediate and mid-term effects of pyrimethanil toxicity on microalgae by simulating an episodic contamination. *Chemosphere*, *120*, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.023>
- Shinn, C., Delello-Schneider, D., Mendes, L. B., Sanchez, A. L., Müller, R., Espíndola, E. L. G., & Araújo, C. V. M. (2015b). Immediate and mid-term effects of pyrimethanil toxicity on microalgae by simulating an episodic contamination. *Chemosphere*, *120*, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.023>
- Shrivastava, M., Feng, J., Coles, M., Clark, B., Islam, A., Dumeaux, V., & Whiteway, M. (2021). Modulation of the complex regulatory network for methionine biosynthesis in fungi. *Genetics*, *217*(2). <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAA049>
- Siew, L. T., Boer, V. M., Daran-Lapujade, P., Walsh, M. C., De Winde, J. H., Daran, J. M., & Pronk, J. T. (2005). Two-dimensional transcriptome analysis in chemostat cultures: Combinatorial effects of oxygen availability and macronutrient limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(1), 437–447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410573200>
- Snoek, T., Chaberski, E. K., Ambri, F., Kol, S., Bjørn, S. P., Pang, B., Barajas, J. F., Welner, D. H., Jensen, M. K., & Keasling, J. D. (2020a). Evolution-guided engineering of small-molecule biosensors. *Nucleic Acids Research*, *48*(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz954>
- Snoek, T., Chaberski, E. K., Ambri, F., Kol, S., Bjørn, S. P., Pang, B., Barajas, J. F., Welner, D. H., Jensen, M. K., & Keasling, J. D. (2020b). Evolution-guided engineering of small-molecule biosensors. *Nucleic Acids Research*, *48*(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz954>
- Song, Y., Gibney, P., Cheng, L., Liu, S., & Peck, G. (2020). Yeast Assimilable Nitrogen Concentrations Influence Yeast Gene Expression and Hydrogen Sulfide Production During Cider Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01264>
- Strutynska, N., Goshovska, Y., Mys, L., Strutynskyi, R., Luchkova, A., Fedichkina, R., Okhai, I., Korkach, Y., & Sagach, V. (2023). Glutathione restores the mitochondrial redox status and improves the function of the cardiovascular system in old rats. *Frontiers in Physiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1093388>
- Teixeira, M. C., Dias, P. J., Simões, T., & Sá-Correia, I. (2008). Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of FLR1 under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *367*(2), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.056>
- Teixeira, M. C., Fernandes, A. R., Mira, N. P., Becker, J. D., & Sá-Correia, I. (2006). Early transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to stress imposed by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Yeast Research*, *6*(2), 230–248. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00041.x>

- Tleuova, A. B., Wielogorska, E., Talluri, V. S. S. L. P., Štěpánek, F., Elliott, C. T., & Grigoriev, D. O. (2020). Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 326, pp. 468–481). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.035>
- Tran, K., Jethmalani, Y., Jaiswal, D., & Green, E. M. (2018). Set4 is a chromatin-associated protein, promotes survival during oxidative stress, and regulates stress response genes in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 293(37), 14429–14443. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003078>
- Tsalidis, G. A. (2022). Human Health and Ecosystem Quality Benefits with Life Cycle Assessment Due to Fungicides Elimination in Agriculture. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 14, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su14020846>
- Tudi, M., Ruan, H. D., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 3, pp. 1–24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>
- Umetsu, N., & Shirai, Y. (2020). Development of novel pesticides in the 21st century. In *Journal of Pesticide Science* (Vol. 45, Issue 2, pp. 54–74). Pesticide Science Society of Japan. <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.D20-201>
- Vanni, A., Anfossi, L., Cignetti, A., Baglieri, A., & Gennari, M. (2006). Degradation of pyrimethanil in soil: Influence of light, oxygen, and microbial activity. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 41(1), 67–80. <https://doi.org/10.1080/03601230500234927>
- Velki, M., Weltmeyer, A., Seiler, T. B., & Hollert, H. (2019). Acute toxicities and effects on multixenobiotic resistance activity of eight pesticides to the earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(5), 4821–4832. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3959-x>
- Venkatesh, A. G., Sun, A., Brickner, H., Looney, D., Hall, D. A., & Aronoff-Spencer, E. (2015). Yeast dual-affinity biobricks: Progress towards renewable whole-cell biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.044>
- Verma, D., & Gupta, V. (2021). New insights into the structure and function of an emerging drug target CysE. In *3 Biotech* (Vol. 11, Issue 8). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02891-9>
- Vopálenská, I., Váchová, L., & Palková, Z. (2015). New biosensor for detection of copper ions in water based on immobilized genetically modified yeast cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 72, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.006>
- Wang, J., Zhai, H., Rexida, R., Shen, Y., Hou, J., & Bao, X. (n.d.). *Developing synthetic hybrid promoters to increase constitutive or diauxic shift-induced expression in Saccharomyces cerevisiae*. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy098/5094560>
- Wang, Y., Wu, S., Chen, J., Zhang, C., Xu, Z., Li, G., Cai, L., Shen, W., & Wang, Q. (2018). Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. *Chemosphere*, 192, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.129>
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). *The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation* Keywords. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>

- Williams, T. C., Xu, X., Ostrowski, M., Pretorius, I. S., & Paulsen, I. T. (2017). Positive-feedback, ratiometric biosensor expression improves high-throughput metabolite-producer screening efficiency in yeast. *Synthetic Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1093/synbio/ysw002>
- Xu, D., Yu, G., Xi, P., Kong, X., Wang, Q., Gao, L., & Jiang, Z. (2018). Synergistic effects of resveratrol and pyrimethanil against *Botrytis cinerea* on grape. *Molecules*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/molecules23061455>
- Yadav, V., Shitiz, K., Pandey, R., & Yadav, J. (2011). Chlorophenol stress affects aromatic amino acid biosynthesis—a genome-wide study. *Yeast*, 28(1), 81–91. <https://doi.org/10.1002/yea.1825>
- Zhang, Y., Fu, Y., Luo, C., & Zhu, F. (2021a). Pyrimethanil sensitivity and resistance mechanisms in *penicillium digitatum*. *Plant Disease*, 105(6). <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1739-RE>
- Zhang, Y., Fu, Y., Luo, C., & Zhu, F. (2021b). Pyrimethanil sensitivity and resistance mechanisms in *penicillium digitatum*. *Plant Disease*, 105(6). <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1739-RE>
- Zhang, Z. X., Wang, L. R., Xu, Y. S., Jiang, W. T., Shi, T. Q., Sun, X. M., & Huang, H. (2021). Recent advances in the application of multiplex genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 105, Issue 10, pp. 3873–3882). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11287-x>
- Zhao, H., Zhang, Y., Pan, M., Song, Y., Bai, L., Miao, Y., Huang, Y., Zhu, X., & Song, C. P. (2019). Dynamic imaging of cellular pH and redox homeostasis with a genetically encoded dual-functional biosensor, pHaROS, in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 294(43), 15768–15780. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007557>