

Determinación de Mutaciones Supresoras en Cepas de *Bacillus subtilis* Deficientes en los Genes *nusG* y *mfd*

Determination of Suppressor Mutations in *Bacillus subtilis* Strains Deficient for *nusG* and *mfd*

Roa Alcalá, Víctor Manuel¹, Abundiz Yáñez, Karen², Pedraza Reyes, Mario³.

¹Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato
vm.roaalcala@ugto.mx

²Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato
k.abundizyanez@ugto.mx

³Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato
pedrama@ugto.mx

Resumen

La bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis* es capaz de adaptarse y sobrevivir en entornos limitantes del crecimiento activando, entre otros, un proceso denominado mutagénesis adaptativa, o asociada a la fase estacionaria (MFE). La MFE ocurre en células quiescentes capaces de promover mutaciones bajo una presión selectiva no letal que les permitirá sobreponerse a las condiciones selectivas y proliferar. Para estudiar este fenómeno en *Bacillus subtilis*, Sung y Yasbin desarrollaron un sistema de ganancia de función empleando la cepa YB955 que contiene tres auxotrofías cromosómicas (*hisC952*, *metB5*, *leuC427*). Este sistema mide la producción de colonias auxótrofas His⁺, Met⁺, y Leu⁺ en la etapa post-exponencial del crecimiento, bajo condiciones de inanición a los aminoácidos correspondientes. El estrés intracelular, o promovido por agentes exógenos pueden generar lesiones en el ADN, las cuales pueden bloquear la elongación de la maquinaria transcripcional promoviendo mutaciones ventajosas; a este proceso se le denomina Mutagénesis Asociada a la Transcripción (MAT). En *B. subtilis* se han descrito 7 factores transcripcionales asociados a la ARN polimerasa, incluyendo a NusG y Mfd, necesarios para la pausa, elongación y terminación transcripcional y para acoplar la reparación con la transcripción, respectivamente. Reportes previos demostraron que NusG y Mfd promueven la MFE. En este estudio se analizaron los porcentajes de mutaciones supresoras y posibles reversiones de la cepa de *Bacillus subtilis* YB955 con interrupciones individuales o simultáneas en los genes *nusG* y *mfd*, para elucidar los posibles mecanismos de reversión y el papel de *nusG* y *mfd* bajo condiciones de estrés nutricional. Los resultados obtenidos sugieren que la interrupción de *mfd* y/o *nusG* impactan leve, pero significativamente la generación de mutaciones supresoras respecto a la cepa parental YB955. Sin embargo, el análisis del porcentaje de mutaciones supresoras reveló la existencia de colonias con triples reversiones en los alelos mutantes bajo estudio. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la supresión y/o inactivación de *nusG* y *mfd* propician la MAT en células de *B. subtilis* en ayuno y carentes de división.

Palabras clave: *Bacillus subtilis* YB955; *nusG*; *mfd*; estrés nutricional; Mutagénesis de Fase Estacionaria; Mutagénesis Asociada a la Transcripción.

Introducción

En entornos donde las condiciones ambientales son desfavorables para el crecimiento, las bacterias activan mecanismos de sobrevivencia. Durante la fase post-exponencial del crecimiento, *B. subtilis* es capaz de establecer diferentes estrategias para adaptarse y sobrevivir incluyendo, la esporulación, la producción de metabolitos secundarios, la hipermotilidad, la competencia celular y la mutagénesis adaptativa, o de fase estacionaria (MFE) [1]. En este contexto, la replicación disminuye o se apaga completamente; sin embargo, la maquinaria transcripcional debe mantenerse activa para asegurar la expresión de genes necesarios para la supervivencia y activación de las rutas de diferenciación celular arriba descritas [1,4]. Es aquí donde el material genético se ve susceptible a daños endógenos o exógenos que promuevan lesiones en el ADN, las cuales pueden bloquear la elongación de la transcripción al impedir el desplazamiento de la ARN polimerasa activando procesos de evasión transcripcional (bypass) o insertando nucleótidos incorrectos cerca del sitio

afectado, generando transcritos mutados, proceso conocido como retromutagénesis o síntesis de translesión de la ARN polimerasa. Para corregirlo se emplea un mecanismo conocido como reparación acoplada a la transcripción [4,5,6]. La generación de transcritos mutados es el producto del proceso conocido como mutagénesis transcripcional, que es favorecida en condiciones de estrés celular reflejándose aún más en aquellas regiones altamente transcritas dentro del genoma [4].

Se entiende por mutagénesis asociada a la fase estacionaria al fenómeno en el que las bacterias que no se encuentran creciendo activamente adquieren mutaciones bajo una presión selectiva no letal, como la limitación de nutrientes u otras condiciones estresantes. Estas mutaciones promueven variabilidad genética y permitirán a las bacterias sobreponerse a las condiciones selectivas y proliferar mediante cambios en su expresión genética [1,2, 3]. Para estudiar la MFE en *B. subtilis*, Sung y Yasbin desarrollaron un sistema de ganancia de función en la cepa de *Bacillus subtilis* YB955 que contiene tres auxotrofías cromosómicas a los aminoácidos histidina, metionina y leucina (*hisC952*, *metB5*, *leuC427*). Las auxotrofías son generadas por mutaciones puntuales: en el alelo de histidina ocurre en la posición 952 y es una transición de una Citosina a una Timina; el cambio en el alelo de metionina es en la base número 346 con la transversión de una Guanina por una Timina, y para el alelo de leucina ocurre una transición de una Guanina por una Adenina. Por lo anterior, en los alelos *hisC* y *metB* hay una mutación sin sentido en la que se genera un codón de paro prematuro (amber y ocre, respectivamente), que interrumpe la síntesis de la proteína a la que codifica. La mutación en el alelo *leuC* es una mutación con cambio de sentido generando una proteína mutada. En este sistema de ganancia de función, se lleva a la fase estacionaria a un cultivo de las cepas en estudio en medios mínimos deficientes de los aminoácidos histidina, metionina o leucina y se lleva el conteo durante los 10 días posteriores, contabilizando las colonias con fenotipo His⁺, Met⁺ o Leu⁺ para calcular la frecuencia de reversión ajustada a la cuenta viable. Las colonias que crecen durante los dos primeros días son descartadas como mutantes generadas en la MFE porque se atribuye su crecimiento a la fase de crecimiento activo [1,2].

Las mutaciones adquiridas en la etapa post-exponencial que generan colonias protótrofas a histidina y metionina en condiciones de inanición en los aminoácidos a los que es auxótrofa la cepa de YB955 pueden ser atribuidas a reversiones verdaderas o mutaciones supresoras [7]. Para el caso del alelo de leucina, las prototrofías se atribuyen a reversiones verdaderas o a mutaciones de segundo sitio, estas últimas se refieren a mutaciones que ocurren en otra región dentro del mismo gen y que pueden restablecer la síntesis de la proteína, sin revertir la mutación original [2,7]. Se ha reportado que en la cepa YB955 un porcentaje alto de las mutaciones en los alelos histidina y metionina son suprimidas por el alelo *sup-3* y otras mutaciones supresoras menos caracterizadas [2]. Para la cepa YB955, Sung y Yasbin encontraron que el porcentaje de mutaciones supresoras de colonias Met⁺ que crecen también en medio His⁻ es mayor a 90%, en cambio el porcentaje de colonias His⁺ que crecen en medio Met⁻ es menor al 20%, dentro de estos experimentos únicamente un 0.6% (3/500) de colonias analizadas mostraron un fenotipo His⁺ Met⁺ Leu⁺ (triple revertante) [2].

En *B. subtilis* se han descrito 7 factores asociados a la transcripción, que son un grupo de proteínas accesorias asociadas a la ARN polimerasa, estas son NusA, NusB, NusE, NusG, Rho, GreA y Mfd. NusG es una proteína que forma un complejo con la ARN polimerasa, tiene acceso a la cadena no transcrita del ADN promoviendo la pausa dependiente de secuencia rica en timina (TTNTTT), participa en la terminación y anti-terminación de la transcripción, mejora la elongación transcripcional y su procesividad, además es partícipe del acoplamiento y reclutamiento de proteínas accesorias de la traducción. Mfd es una proteína implicada en dirigir la reparación acoplada a la transcripción, reclutamiento del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER), desensambla la ARN polimerasa cuando existen dímeros de pirimidina u otras lesiones en el ADN, dirige la mutagénesis transcripcional por bypass transcripcional y promueve la mutagénesis de fase estacionaria [5]. En estudios recientes, se demostró el papel de los genes *nusG* y *mfd* en *B. subtilis* y su relación con la mutagénesis de fase estacionaria. Se describió que *nusG* y *mfd* son genes promutagénicos en condiciones de estrés nutricional, y que probablemente actúan por vías independientes. También se demostró que la interrupción de ambos genes *mfd* y *nusG* suprime la mutagénesis de fase estacionaria [5].

Retomando el concepto de la mutagénesis transcripcional y los resultados obtenidos en el estudio de Negrete-Durán [5] sobre el papel de *mfd* y/o *nusG* en la MFE, en este trabajo se analizó el impacto de estos factores en la generación de mutaciones supresoras asociadas a la transcripción, bajo condiciones de estrés nutricional que limitan el crecimiento de *B. subtilis*.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas

Tabla 1. Cepas de *Bacillus subtilis* utilizadas para la determinación de mutaciones supresoras.

| Cepa | Descripción | Referencia |
|----------|---|------------------------------|
| PERM1040 | <i>Bacillus subtilis</i> YB955 Δmfd , Tc ^R | Stock del laboratorio M. P-R |
| PERM1616 | <i>Bacillus subtilis</i> YB955 $\Delta nusG$, Cm ^R | Stock del laboratorio M. P-R |
| PERM1912 | <i>Bacillus subtilis</i> YB955 $\Delta nusG \Delta mfd$, Cm ^R Sp ^R | Stock del laboratorio M. P-R |

Medios de cultivo

Para el crecimiento de las cepas se utilizó medio Luria-Broth (LB) líquido, a este se le adicionó agar bacteriológico 15 g/L para preparar medios sólidos en placas. Según cada cepa se suplementó con los antibióticos tetraciclina (Tc) 5 $\mu\text{g/mL}$, cloranfenicol (Cm) 5 $\mu\text{g/mL}$, tetraciclina (Tc) 15 $\mu\text{g/mL}$ y/o espectinomicina (Sp) 100 $\mu\text{g/mL}$.

Para el crecimiento de las cepas en los experimentos de mutagénesis de fase estacionaria se utilizó medio Difco A3 (BD Difco, New Jersey, Franklin Lakes).

Para las placas de los experimentos de mutagénesis de fase estacionaria y la determinación de mutaciones supresoras se utilizó el Medio Mínimo de Sales Spizizen (SMM) [2].

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 15 min previo a su uso.

Ensayos de mutagénesis de fase estacionaria

Se utilizó el procedimiento descrito por Sung y Yasbin [2]. A partir de un preinóculo de las cepas de interés, crecido toda la noche a 37°C en agitación constante, se tomaron de 250-500 μL para inocular en 25-50 mL de medio Difco A3 suplementado con elementos traza Ho-Le, el cultivo se incubó a 37°C en agitación constante. El crecimiento se monitoreó determinando la D.O. cada 15-30 minutos con un colorímetro (Biochrom WPA CO7500; Cambridge, Reino Unido) ajustado a una longitud de onda de 600 nm hasta localizar el punto T_0 (donde se interceptan las pendientes de las curvas del crecimiento exponencial y estacionario). A partir de ese punto, el cultivo fue incubado 90 min y, transcurrido este tiempo, colectado por centrifugación a 4800 \times g durante 10 min a temperatura ambiente para obtener la pastilla celular, la cual se lavó y resuspendió en 10 mL de PBS. Finalmente, se plaquearon de 50-200 μL de la suspensión celular en diez placas Medio Mínimo de Sales Spizizen para His⁺, Met⁺ y Leu⁺, se incubaron a 37°C [2]. El número de colonias revertantes en las placas se contó diariamente durante 10 días. Las colonias que crecieron durante los primeros seis días fueron descartadas y a partir del séptimo día se seleccionaron las colonias de interés.

Determinación de mutaciones supresoras y posibles reversiones

Las colonias que crecieron de los días número siete al diez se seleccionaron y transfirieron a placas de Medio Mínimo de Sales Spizizen en el mismo aminoácido de selección, se incubaron a 37°C por 48 h y se contaron el número de colonias revertantes siendo este el 100 % de las mutantes obtenidas de los ensayos de MFE. Estas mismas colonias se transfirieron a placas Medio Mínimo Sales Spizizen con los otros aminoácidos en que no se hizo la selección. Se incubaron a 37°C por 48 h y finalmente se determinó el porcentaje de colonias que crecieron del total en los otros dos aminoácidos en que no se hizo la selección inicial. El porcentaje de posibles mutaciones supresoras se determinaron para los casos de las colonias con fenotipo His⁺ Met⁺ de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ mutaciones supresoras} = \frac{\text{No. colonias His}^+ \text{ que crecen también en SMM Met}^-}{\text{No. colonias His}^+ \text{ analizadas}}$$

$$\% \text{ mutaciones supresoras} = \frac{\text{No. colonias } Met^+ \text{ que crecen también en SMM } His^-}{\text{No. colonias } Met^+ \text{ analizadas}}$$

Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico de las colonias de *Bacillus subtilis* YB955 Δmfd , *Bacillus subtilis* YB955 $\Delta nusG$ y *Bacillus subtilis* YB955 $\Delta nusG \Delta mfd$ con fenotipo $His^+ Met^+ Leu^+$ producto de los ensayos de mutagénesis de fase estacionaria se siguió el protocolo descrito por Cutting y Vanderhorn [9].

Amplificación de los fragmentos de los genes *hisC*, *metB* y *leuC* mediante PCR

Se utilizó ADN genómico como molde de las colonias de *Bacillus subtilis* YB955 Δmfd , *Bacillus subtilis* YB955 $\Delta nusG$ y *Bacillus subtilis* YB955 $\Delta nusG \Delta mfd$ con fenotipo $His^+ Met^+ Leu^+$, producto de los ensayos de mutagénesis de fase estacionaria, para la amplificación para la futura secuenciación de las mutantes generadas. La mezcla de reacción para 30 reacciones de 9.5 μ L cada una, estaba compuesta de: 242 μ L de agua grado biología molecular, 30 μ L de Buffer, 6 μ L de dNTPs, 2 μ L del oligonucleótido directo, 2 μ L del oligonucleótido reverso, 3 μ L de enzima Vent polimerasa. A cada correspondiente reacción se le añadieron 0.5 μ L de ADN genómico de cada respectiva colonia. Las condiciones de la PCR se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para la amplificación de los fragmentos de los genes *hisC*, *metB* y *leuC* por PCR para las colonias de *B. subtilis* deficientes de los genes *nusG* y *mfd* con fenotipo $His^+ Met^+ Leu^+$.

| Evento | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Número de ciclos |
|----------------------------------|---|-------------------------------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 95 | 3 | ----- |
| Desnaturalización | 95 | 0.5 | |
| Alineamiento de oligonucleótidos | 62 ^a , 63 ^b , 69 ^c | 0.3 ^c 0.5 ^{a,b} | 30 |
| Extensión | 72 | 0.5 | |
| Extensión final | 72 | 5 | ----- |
| Mantenimiento | 4 | indefinido | ----- |

^{a, b, c} corresponden a las temperaturas y tiempo de alineamiento para la amplificación de los genes *metB*, *leuC* e *hisC*, respectivamente.

Resultados y Discusión

Inicialmente se realizaron experimentos de MFE con las cepas YB955 y deficientes en *Mfd*, *NusG* o en ambos factores como se describió en Materiales y Métodos. Las colonias tardías con fenotipos His^+ , Met^+ o Leu^+ obtenidas de cada una de las cepas en estudio, se utilizaron para investigar si las prototrofías asociadas a estas provenían de mutaciones supresoras o reversiones verdaderas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

En referencia a las colonias His^+ , no se observaron diferencias importantes en el porcentaje de colonias que también generaron la prototrofia Met^+ entre la cepa parental YB955 y la cepa deficiente en *Mfd* (Tabla 3). Estos resultados sugieren que solo un 20% de las mutaciones His^+ son producto de mutaciones supresoras y no incrementa este valor (Tabla 3). Para el caso de las mutantes *nusG* y *nusG/mfd*, el porcentaje de colonias $His^+ Met^+$ disminuyó significativamente, a 0% y 4 %, respectivamente. Esto sugiere que la supresión y/o inactivación de estos factores promueven las reversiones verdaderas en el gen mutante *hisC952*.

Tabla 3. Crecimiento de colonias revertantes con fenotipo His⁺, Met⁺ o Leu⁺ de las cepas deficientes de los genes *nusG* y *mfd* obtenidas en los diferentes medios de selección durante los ensayos de mutagénesis de fase estacionaria.

| Revertantes | Medios de selección | | | Colonias con fenotipo His ⁺ Met ⁺ Leu ⁺ |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
| | His ⁻ SMM | Met ⁻ SSM | Leu ⁻ SSM | |
| YB955* | | | | |
| His ⁺ | 104/104 (100 %) | 15/104 (14.4 %) | 0/104 (0 %) | 0 (0 %) |
| Met ⁺ | 68/78 (87.2 %) | 78/78 (100 %) | 0/78 (0 %) | 0 (0%) |
| Leu ⁺ | 0/113 (0 %) | 0/113 (0 %) | 113/113 (100 %) | 0 (0 %) |
| <i>Δmfd</i> | | | | |
| His ⁺ | 81/81 (100 %) | 15/81 (18.5 %) | 0/81 (0 %) | 0 (0 %) |
| Met ⁺ | 94/94 (100 %) | 94/94 (100 %) | 1/94 (1.1 %) | 1 (1.1 %) |
| Leu ⁺ | 11/12 (91.6 %) | 7/12 (58.3 %) | 12/12 (100 %) | 6 (50%) |
| <i>ΔnusG</i> | | | | |
| His ⁺ | 53/53 (100 %) | 0/53 (0 %) | 0/53 (0 %) | 0 (0 %) |
| Met ⁺ | 76/80 (95 %) | 80/80 (100 %) | 58/80 (72.5 %) | 58 (72.5 %) |
| Leu ⁺ | 10/68 (14.7 %) | 6/68 (8.8 %) | 68/68 (100 %) | 4 (5.9 %) |
| <i>ΔnusG Δmfd</i> | | | | |
| His ⁺ | 100/100 (100 %) | 4/100 (4 %) | 3/100 (3 %) | 2 (2 %) |
| Met ⁺ | 51/61 (83.6 %) | 61/61 (100 %) | 4/61 (6.6 %) | 4 (6.6 %) |
| Leu ⁺ | 1/1 (100 %) | 1/1 (100 %) | 1/1 (100 %) | 1 (100 %) |

*Para la cepa parental YB955 se tomaron los datos reportados por Abundiz-Yáñez [8].

La pérdida individual o combinada de NusG y Mfd no afectó significativamente el alto porcentaje de colonias con doble prototrofia His⁺ Met⁺ observado en la cepa parental YB955 (Tabla 3). Estos resultados sugieren que ni NusG, ni Mfd, afectan la capacidad de la cepa YB955 de generar mutaciones supresoras en el alelo mutante *metB5*.

La obtención de revertantes Leu⁺ en las cepas mutantes *mfd* y *mfd/nusG* disminuyó dramáticamente respecto a las cepas YB955 y la cepa deficiente en NusG (Tabla 3). Sin embargo, el análisis del porcentaje de revertantes Leu⁺ reveló un incremento significativo en la producción de colonias que portaban reversiones simultáneas en los alelos mutantes *hisC* y *metB* (es decir, triples revertantes). Estos resultados contrastan con observaciones previas [2, 8] que reportaron que del total de las colonias con fenotipo Leu⁺ analizadas, el 100 % son incapaces de crecer en His⁺ Met⁺. Este hecho se atribuye a que las mutaciones en el gen *leuC* son generadas por eventos intragénicos [2,8]. En este estudio también se observó la aparición de colonias con fenotipo Leu⁺ Met⁺ y Leu⁺ His⁺, lo cual sugiere que la ausencia de *nusG* y *mfd* propicia mutaciones en regiones genómicas distintas al gen *leuC*.

Interesantemente, la producción de revertantes con fenotipo His⁺ Met⁺ Leu⁺ (triple revertante) ocurrió con baja frecuencias en las cepas con deficiencias en Mfd y Mfd/NusG. Así, en la cepa *ΔnusG/Δmfd*, de un total de 162 colonias Leu⁺ analizadas, solo un 4.32% presentaron este fenotipo; en tanto que en la cepa *Δmfd* solo 3.74% de 187 colonias analizadas mostraron este fenotipo. Para el caso de la cepa *ΔnusG* las colonias con

la reversión triple representaron el porcentaje más alto que ascendió a 30.85% de un total de 201 colonias analizadas. Sung y Yasbin reportaron que, de 500 colonias analizadas, únicamente un 0.6 % tenía fenotipo His⁺ Met⁺ Leu⁺ [2], un porcentaje mucho menor a lo observado en este trabajo. Estos resultados sugieren fuertemente que la ausencia de *mfd* y sobre todo de *nusG*, impactan en la generación de mutaciones en alelos distintos al de selección, posiblemente debido a su función en la regulación de la transcripción.

Algunas de las colonias con fenotipo His⁺ Met⁺ Leu⁺ fueron procesadas para la extracción de ADN cromosomal como se describió en Materiales y Métodos. En experimentos futuros se amplificarán y sujetarán a secuenciación las regiones de los genes *hisC*, *metB*, y *leuC* que dan lugar a las auxotrofías. Esta estrategia permitirá esclarecer el papel que juegan Mfd y NusG en promover variabilidad genética para permitir a *B. subtilis* escapar de las condiciones que limitan su crecimiento.

Conclusiones

Se determinó el porcentaje de mutaciones supresoras obtenidas en los ensayos de MFE de cepas de *B. subtilis* YB955 deficientes en los genes *nusG* y/o *mfd*.

Agradecimientos

Trabajo apoyado por CONAHCYT (Subsidios A-1S-27116 y CBF2023-2024-708) y la Universidad de Guanajuato (Subsidio CIIC-029-2024)

Referencias

- [1] Pedraza-Reyes, M., Abundiz-Yañez, K., Rangel-Mendoza, A., Martínez, L. E., Barajas-Ornelas, R. C., Cuéllar-Cruz, M., Leyva-Sánchez, H. C., Ayala-García, V. M., Valenzuela-García, L. I., & Robleto, E. A. (2024). *Bacillus subtilis* stress-associated mutagenesis and developmental DNA repair. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/mubr.00158-23>
- [2] Sung, H., & Yasbin, R. E. (2002). Adaptive, or Stationary-Phase, Mutagenesis, a Component of Bacterial Differentiation in *Bacillus subtilis*. *Journal Of Bacteriology*, 184(20), 5641-5653. <https://doi.org/10.1128/jb.184.20.5641-5653.2002>
- [3] Robleto, E. A., Yasbin, R., Ross, C., & Pedraza-Reyes, M. (2007). Stationary Phase Mutagenesis in *B. subtilis*: A Paradigm to Study Genetic Diversity Programs in Cells Under Stress. *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology*, 42(5), 327-339. <https://doi.org/10.1080/10409230701597717>
- [4] Doetsch, P. W. (2002). Translesion synthesis by RNA polymerases: occurrence and biological implications for transcriptional mutagenesis. *Mutation Research*, 510(1-2), 131-140. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(02\)00258-0](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00258-0)
- [5] Negrete Durán, E. A. (2023). *Papel de NusG y Mfd en la mutagénesis asociada a la transcripción de Bacillus subtilis* [Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad de Guanajuato].
- [6] Holmquist, G. P. (2002). Cell-selfish modes of evolution and mutations directed after transcriptional bypass. *Mutation Research*, 510(1-2), 141-152. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(02\)00259-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00259-2)
- [7] Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Mutations and Repair. En *Elsevier eBooks* (pp. 832-879). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813288-3.00026-4>
- [8] Abundiz Yáñez, K. (2022). *Identificación de Blancos Potenciales del Diadenosín Monofosfato Cíclico (c-di-AMP) y Papel de las di-Adenilato Ciclasas en la Mutagénesis de Bacillus subtilis* [Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad de Guanajuato].
- [9] Harwood, C. R., & Cutting, S. M. (1991). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Wiley.