

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192250 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.20

(22) Дата подачи заявки
2020.02.14

(51) Int. Cl. *A01N 57/16* (2006.01)
A01N 63/60 (2020.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A01P 5/00 (2006.01)
A01P 7/02 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)
A01P 13/02 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СМЕСЬ МОЛЕКУЛ ДНК, ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА И СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА

(31) 2022581

(32) 2019.02.14

(33) NL

(86) PCT/NL2020/050086

(87) WO 2020/167128 2020.08.20

(71) Заявитель:
КОППЕРТ Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Диано Марчелло Мария, Лорито
Маттео, Маццолени Стефано (IT),
Миккелсен Харальд Гейсберт (NL)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим смесь молекул ДНК, пригодных для ингибирования целевых видов, способам и применениям, использующим указанные композиции, и способам получения композиций. Указанные композиции могут применяться, помимо прочего, в области медицины и (или) ветеринарии для борьбы с вредителями и (или) заболеваниями в сельском хозяйстве или в других областях, где полезно ингибирование одного или более целевых видов.

A1

202192250

202192250

A1

КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СМЕСЬ МОЛЕКУЛ ДНК, ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА И СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим смесь молекул ДНК, пригодных для ингибирования целевых видов, способам и применениям, использующим указанные композиции, и способам получения композиций. Указанные композиции могут применяться, помимо прочего, в области медицины и (или) ветеринарии, для борьбы с вредителями и (или) заболеваниями в сельском хозяйстве или в других областях, где полезно ингибирование одного или более целевых видов.

Предшествующий уровень техники

В последние годы стало понятно, что фрагментированные ДНК видов оказывают ингибирующее воздействие на виды, из которых они получены, а также на филогенетически подобные виды со сходным геномом. Первыми публикациями, раскрывающими этот само-ингибирующий эффект фрагментов ДНК, являются международная патентная заявка WO2014/020624 и итальянская приоритетная заявка NA2012A000046. Эти документы заостряют внимание, в основном, на недавно открытых эффектах само-ингибирующих фрагментов ДНК, которые, согласно этим публикациям, получают, воздействуя ультразвуком, теплом или пиролизом на цельную ДНК, выделенную из видов, активность которых необходимо ингибировать (или из филогенетически подобных видов), или путем статистического синтеза фрагментов ДНК, исходя из цельной ДНК видов (или филогенетически подобных видов).

С целью более эффективного использования фрагментов ДНК для ингибирования биологических видов желательно разработать дополнительные способы их производства в эффективной форме. Неожиданно было обнаружено, что фрагменты ДНК ингибируемых видов эффективны после включения в ДНК, полученные не из ингибируемых видов. Основываясь на этом удивительном открытии, авторы настоящего изобретения обнаружили, что ингибирующие фрагменты ДНК видов можно также эффективно производить в видах-хозяевах, не связанных с ингибируемыми видами. Это открывает новые изобретательские возможности для производства ингибирующих фрагментов ДНК.

Сущность изобретения

В соответствии с первым аспектом, изобретение относится к композиции, содержащей смесь молекул ДНК, в которую входят последовательности ДНК из

различных источников, причем смесь содержит несколько первичных последовательностей ДНК, предпочтительно из числа последовательностей хромосомной ДНК, видов, исходных видов, и несколько вторичных последовательностей ДНК из видов, видов-хозяев, отличающихся от исходных видов. В составе композиции смесь молекул ДНК может содержать молекулы химерной ДНК, где последовательности ДНК исходных видов фланкированы по меньшей мере с одного конца последовательностями ДНК не исходных видов, выбранными из последовательностей ДНК видов-хозяев или из последовательностей искусственной ДНК-конструкции. Такая композиция полезна при ингибировании целевых видов, выбранных в качестве исходных, или выбранных из видов, филогенетически подобных исходным видам, тем, что ингибирующие фрагменты ДНК можно получить в видах-хозяевах, филогенетически отдаленных от целевых видов.

Дополнительный аспект изобретения относится к композиции по изобретению для применения в медицине. В виду того, что композиция по изобретению может применяться для ингибирования паразитических и (или) патогенных организмов, она может применяться в медицине и (или) ветеринарии.

Еще один дополнительный аспект изобретения относится к применению композиции по изобретению в качестве продукта для ингибирования целевых видов. Это применение может быть применением в медицине и (или) ветеринарии или, альтернативно, может не относиться к медицине. Примеры не связанного с медициной применения могут, например, включать применение в сельском хозяйстве, где может быть полезно ингибировать паразитические и (или) патогенные организмы и (или) вредителей растений и (или) сельскохозяйственных животных, таких как коровы или домашняя птица, или виды, иным способом мешающим сельскохозяйственному производству, например, сорняки. Альтернативно, композицию можно применять в качестве консерванта, например, для продуктов, подверженных бактериальной порче, таких как пищевые продукты, персональные лекарственные препараты или другие продукты, содержащие соединения, пригодные в качестве субстрата для роста микроорганизмов.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения относится к способу ингибирования видов, целевых видов, включающему воздействие композиции по изобретению на указанные целевые виды. Способ может быть нетерапевтическим или терапевтическим.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения относится к способу получения композиции по изобретению, содержащему следующие действия:

- получение источника ДНК из исходных видов, необязательно, содержащих фрагментированную ДНК исходных видов;

- получение клеток нескольких видов, видов-хозяев, отличающихся от исходных видов;
- воздействие на клетки видов-хозяев условий, позволяющих видам-хозяевам захватить ДНК исходного вида в реплицируемой форме;
- необязательно, выделение клеток вида-хозяина;
- необязательно, выделение ДНК из клеток исходных видов;
- необязательно, фрагментация ДНК, необязательно, выделенных из клеток исходных видов.

Способ полезен тем, что ингибирующая ДНК целевых видов может теперь быть эффективно получена вне целевых видов или филогенетически подобных им. В частности, самоингибирующая ДНК может быть получена в видах, филогенетически не связанных с целевыми видами.

Еще один дополнительный аспект изобретения относится к способу получения сельскохозяйственного продукта. Согласно способу, композиция по изобретению используется для ингибирования паразитических и (или) патогенных организмов и (или) вредителей растений и (или) сельскохозяйственных животных, таких как коровы или домашняя птица, или видов, иным способом мешающих сельскохозяйственному производству. Ингибируя паразитические и (или) патогенные организмы и (или) вредители растений и (или) сельскохозяйственных животных, можно улучшить сельскохозяйственное производство, осуществляемое этими производственными организмами.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 демонстрирует результаты анализа ингибирования из эксперимента 1. Показано влияние коммерческих библиотек *Arabidopsis thaliana* на выживание конспецифичных саженцев. Данные соответствуют среднему и стандартному отклонению для 10 повторов (чашки с 10 саженцами) при обработке каждого вида. Значимые по сравнению с контролем различия обозначены звездочками (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Фигура 2 демонстрирует результаты анализа ингибирования из эксперимента 2. Показано влияние геномных ВАС-библиотек *Cyperus aesculentus* на рост конспецифичных саженцев для двух различных типов субстрата. Данные соответствуют среднему и стандартному отклонению для 10 повторных горшков для каждой обработки. Значимые по сравнению с контролем различия обозначены звездочками (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Фигура 3 демонстрирует результаты анализа ингибирования из эксперимента 3.

Показано влияние геномной ВАС-библиотеки *Caenorhabditis elegans* в среде роста на летальность конспецифичных эмбрионов (верхняя часть) и дефекты развития (нижняя часть), по сравнению со штаммом *E. coli* (EPI300), включая гетерологичную ДНК, но не геномную библиотеку собственной ДНК. Данные соответствуют среднему и стандартному отклонению для 12 повторов для каждой обработки.

Фигура 4 демонстрирует результаты анализа ингибирования из эксперимента 4. Показано влияние коммерческой библиотеки *Spodoptera littoralis* на выживание конспецифичных личинок. Данные соответствуют среднему и стандартному отклонению для 10 повторов для каждой обработки. Значимые по сравнению с контролем различия обозначены звездочками (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Фигура 5 демонстрирует эксперимент 9, общее количество растений *Portulaca* в различных блоках обработки в конце исследования.

Фигура 6 демонстрирует филогенетическое дерево покрытосеменных растений из AGP (2009), использованных в эксперименте 10 для определения филогенетических расстояний.

Фигура 7 демонстрирует рост корней 7 целевых видов растений, обработанных либо собственной ДНК, либо гетерологичной ДНК, извлеченной из гетероспецифичных видов. Каждый столбец соответствует среднему значению и стандартному отклонению для 4 повторов биоанализа. Для каждой панели виды растений, использованных для выделения ДНК, ранжированы по филогенетическому расстоянию от целевых видов, определенному, как описано в способах эксперимента 10.

Подробное описание изобретения

Композиция по изобретению содержит смесь молекул ДНК с последовательностями из различных источников. Смесь молекул ДНК содержит несколько первичных последовательностей ДНК исходных видов, и несколько вторичных последовательностей ДНК видов-хозяев, отличающихся от исходных видов. Специалист в данной области техники понимает, что «вид» означает абстрактную концепцию и вид как таковой не может быть ингибирован. Таким образом, виды следует понимать как индивидуумы или организмы видов, например, множество организмов вида, то есть, популяцию.

Как следует из определения термина «смесь», композиция содержит различные молекулы ДНК. Молекулы ДНК в составе композиции различаются по последовательности и предпочтительно также по размеру. Последовательности молекул ДНК в составе композиции различаются по своей принадлежности к различным источникам. В частности, первичный набор молекул ДНК содержит последовательности

первичных видов, исходных видов, а вторичный набор молекул ДНК содержит последовательности вторичных видов, видов-хозяев, отличающихся от исходных видов. Кроме того, различается количество последовательностей ДНК исходных видов. Дополнительно, различается также количество последовательностей ДНК видов-хозяев. Так, существует различие также в популяции последовательностей ДНК исходных видов и в популяции последовательностей ДНК видов-хозяев.

В композиции последовательности ДНК исходных видов, предпочтительно в качестве частичных последовательностей (фрагментов) хромосомной ДНК, могут быть включены в молекулы ДНК природного генома видов-хозяев, такие как хромосомы или природные плазмиды, выделенные из природного генома клеток видов-хозяев, или могут быть включены в искусственные конструкции ДНК, вводимые в состав клеток видов-хозяев, тем самым образуя химерную ДНК. Альтернативно, последовательности ДНК исходных видов в композиции были высвобождены с разрушением, например, путем фрагментации, из такой химерной ДНК. Таким образом, молекулы ДНК в композиции могут содержать одну или более цельную (интактную) природную хромосому вида, цельную (интактную) природную экстрахромосомную ДНК, такую как природная плазида, видов, цельную (интактную) искусственную конструкцию ДНК, например, выбранную из плазмиды, козмиды, фосмиды или искусственных хромосом, фрагментированные природные хромосомы видов, фрагментированную природную экстрахромосомную ДНК, такую как природные плазмиды, видов, или фрагментированные искусственные конструкции, такие как выбранные из плазмиды, козмиды, фосмиды или искусственных хромосом. В композиции по изобретению могут также присутствовать комбинации таких молекул ДНК. Специалисту в данной области техники понятно, что эти альтернативные молекулы ДНК могут различаться по размеру и последовательности, и в чем может заключаться такое различие.

Молекулы ДНК, содержащие последовательности ДНК исходных видов, и молекулы ДНК, содержащие последовательности ДНК видов-хозяев, предпочтительно представляют собой фрагменты ДНК. Специалист в данной области техники понимает, что термин «фрагментированная ДНК» и родственные термины, такие как «фрагменты ДНК», означают частичную цепочку (или частичную последовательность) более крупной молекулы ДНК. Фрагменты ДНК можно получить путем фрагментации ДНК (разрыва молекул ДНК) или путем синтеза ДНК, начиная от полинуклеотидной матрицы. Таким образом, фрагмент ДНК представляет собой молекулу ДНК, содержащую частичную последовательность более крупной молекулы ДНК. В контексте настоящего изобретения ингибирующие фрагменты ДНК предпочтительно получают путем фрагментации ДНК. В

контексте настоящего изобретения термин «содержащий» и родственные термины, «такие как содержат» включают термин «состоит из».

Фрагменты ДНК можно получить любым подходящим способом, в частности, способами случайной генерации фрагментов ДНК. В заявке WO2014/020624 раскрывается несколько подходящих методов генерации само-ингибирующих фрагментов ДНК. В числе прочих раскрывается воздействие ультразвукового излучения, тепла или пиролиза на выделенную ДНК исходного вида. Альтернативно, для случайной генерации фрагментов ДНК можно использовать рандомный синтез фрагментов ДНК, начиная от ДНК исходных видов. Эти и другие методы генерации фрагментов ДНК известны специалистам в данной области техники и основаны на доступной общей информации, которую они могут использовать. Можно дополнительно сделать ссылку на работы Mann и Krull (Mann and Krull 2004. *Biosensors and Bioelectronics* 20:945–955), Tong et al., (Tong et al, 2006. *Nat. Protoc.* 1(2):729-748), Fan et al (Fan et al, (2008). *Nucleic Acid Research*, 36(19): e125), а также на стандартные протоколы разрезания ДНК для прибора Bioruptor® Pico (доступны на сайте компании Diagenode www.diagenode.com.) Альтернативно, для фрагментации ДНК исходных видов можно использовать эндонуклеазы, такие как ДНКаза I, эндонуклеаза V или ферменты рестрикции.

Фрагментация ДНК часто используется в способах секвенирования ДНК следующего поколения. Специалист в данной области техники может также найти информацию, полученную в связи с фрагментированием ДНК в данном контексте.

Дополнительно, для получения фрагментов ДНК можно также использовать способы синтеза ДНК, которые позволяют получить фракции геномных последовательностей. Например, могут быть приемлемым методики ПЦР, такие как методики рандомной ПЦР. Кроме того, в контексте настоящего изобретения молекулы кДНК, полученные обратной транскрипцией из мРНК, можно считать фрагментами ДНК, так как такие молекулы кДНК представляют частичную последовательность целевой молекулы ДНК. Синтез подходящих молекул кДНК известен специалисту в данной области техники.

Дополнительно, такие процессы, как (биологическое) расщепление, распад и подобные процессы, осуществляемые в отношении биологического материала, такого как клетки, содержащего ДНК, также могут приводить к фрагментации ДНК, содержащейся в биологическом материале. Таким образом, не требуется, чтобы молекулы ДНК, содержащие последовательности ДНК исходных видов, были фрагментами ДНК, так как фрагменты ДНК могут высвобождаться из более крупных молекул в ходе подобных процессов.

Выбранная методика генерации фрагментов ДНК, предпочтительно, является методикой, подходящей для генерации случайных фрагментов ДНК. Случайные фрагменты ДНК следует понимать как фрагменты ДНК, генерированные случайным образом. То есть, это фрагменты ДНК, генерированные без заранее заданного паттерна.

В ходе исследований, связанных с фрагментацией ДНК в контексте секвенирования ДНК (следующего поколения), получена информация, что некоторые методики фрагментации ДНК случайным образом, такие как (частичное) расщепление рестриктазами и воздействие ультразвуком, могут быть в некоторой степени смещены в отношении некоторых областей и (или) последовательностей генома. Как специалист в данной области техники поймет из описания ингибирования собственной ДНК, описанного в WO2014/020624, это смещение не связано с ингибирующим действием случайно генерированных фрагментов собственной ДНК.

В композиции по настоящему изобретению молекулы ДНК предпочтительно представлены в виде двухцепочечных молекул ДНК (дцДНК). Это не означает, что молекулы ДНК осуществляют свою биологическую ингибирующую функцию обязательно в двухцепочечном виде. Не ограничивая себя этой теорией, представляется разумным предположить, что в случае двухцепочечных молекул ДНК в ингибирующем действии участвуют одноцепочечные молекулы ДНК, образующиеся в ходе (частичного) раскручивания дцДНК. Таким образом, молекулы ДНК в двухцепочечной форме могут реализовывать ингибирующее действие посредством механизмов (частичного) раскручивания ДНК. Композиция может содержать молекулы ДНК, содержащие последовательности ДНК исходных видов, размер которых находится в диапазоне от около 50 оснований (пар оснований, п.о.) до около 2 Мегабаз ($2 \cdot 10^6$ п.о.), например, от 50 до 3000 п.о., от 100 до 1500 п.о., от 100 до 2000 п.о., от 100 до 2500 п.о., или, альтернативно, от 0,3 до 15 т.п.о., например, от 1 до 10 т.п.о., например, от 5 до 10 т.п.о., или альтернативно от 15 до 60 т.п.о., например, от 15 до 40 т.п.о., от 25 до 40 т.п.о., или, альтернативно, 40 до 340 т.п.о., например, от 50 до 200 т.п.о., например, от 120 до 300 т.п.о., например, от 200 до 300 т.п.о., или, альтернативно, от 250 т.п.о. до 2 Мегабаз, например, от 400 т.п.о. до 1500 т.п.о. или от 400 т.п.о. до 1000 т.п.о., или, альтернативно, от 0,3 до 2 Мегабаз, например, от 1 т.п.о. до 2 Мегабаз, например, от 10 т.п.о. до 2 Мегабаз, например, от 100 т.п.о. до 2 Мегабаз, например, от 360 т.п.о. до 1 Мегабаз. В зависимости от того, являются ли последовательности ДНК исходных видов свободными фрагментированными последовательностями ДНК, или они включены в более крупные молекулы ДНК, содержащие последовательности ДНК исходных видов, их размер может различаться. Свободные фрагментированные последовательности ДНК

предпочтительно характеризуются размерами, находящимися, в основном, в нижней части диапазонов. Последовательности ДНК исходных видов, включенные в более крупные молекулы ДНК, будут иметь максимальный диапазон размеров, в зависимости от того, что может быть стабильно включено в соответствующую молекулу ДНК. Специалист в данной области техники знает и понимает, что различные векторы клонирования и (или) экспрессии могут использовать различные размеры вставок ДНК. В таблице 1 содержится обзор различных векторных систем клонирования/экспрессии, задействованных в некоторых воплощениях настоящего изобретения с размерами соответствующих вставок согласно этим воплощениям. Если композиция содержит ДНК искусственной конструкции ДНК (вектор, в частности, вектор клонирования), предпочтительно, чтобы искусственная конструкция ДНК была выбрана из плазмиды, космиды, фосмиды или искусственной хромосомы, такой как бактериальная искусственная хромосома, искусственная хромосома дрожжей или искусственная хромосома грибов.

Таблица 1

Свободная фрагментированная ДНК	Включение в плазмиду	Включение в фосмиду	Включение в ВАС	Включение в YAC	Включение в природные хромосомы
50-3000 п.о.	0,3-15 т.п.о.	15-60 т.п.о.	40-340 т.п.о.	250 т.п.о. – 2 Мегабаз	0,3 т.п.о. – 2 Мегабаз

Композиция предпочтительно содержит фрагменты хромосомной ДНК исходных видов и (или) видов-хозяев. Специалист в данной области техники понимает значение термина «хромосомная ДНК» и сможет получить хромосомные ДНК определенных организмов, из которых могут быть получены фрагменты ДНК.

Виды, из которых получают последовательности ингибирующей ДНК, в данном описании и в формуле обозначают как «исходные виды». Должно быть понятно, что термин «исходные виды» используется в качестве определения. Он используется, чтобы можно было легко отличить исходные виды от «видов-хозяев» и «целевых видов», которые будут подробно рассмотрены ниже.

В соответствии с некоторыми воплощениями изобретения молекулы ДНК в композиции по изобретению могут быть свободной ДНК. Термин «свободная ДНК» означает состояние, когда фрагменты ДНК не включены в оболочку, такую как клетка или вирусная частица. Фрагменты ДНК могут быть предоставлены в любой подходящей форме. Например, фрагменты свободной ДНК могут находиться в растворе подходящего растворителя, такого как вода или водная смесь. Растворитель может быть частью однофазного раствора или многофазной системы, такой как эмульсия или дисперсия.

Альтернативно, фрагменты свободной ДНК могут присутствовать в составе композиции по изобретению в твердой форме. Твердая форма, содержащая свободную ДНК, может представлять собой однофазную или многофазную систему, такую как дисперсия. В соответствии с некоторыми воплощениями, в композиции по изобретению смесь молекул ДНК содержит молекулы химерной ДНК, где последовательности ДНК исходных видов фланкированы по меньшей мере с одного конца последовательностями ДНК неисходных видов. Специалист в данной области техники понимает значение термина «химерная молекула ДНК» и понимает, что этот термин означает молекулу ДНК, содержащую последовательности ДНК по меньшей мере двух различных видов, такие как первого вида и по меньшей мере одного другого вида, такого как из второго вида, отличающегося от первого вида. Таким образом, последовательность ДНК исходного вида и фланкирующая последовательность ДНК по меньшей мере одного неисходного вида находятся в составе одной молекулы ДНК. Химерную молекулу ДНК можно альтернативно называть гибридной молекулой ДНК.

В молекулах химерной ДНК последовательности ДНК исходных видов фланкированы по меньшей мере с одной стороны последовательностями ДНК неисходных видов. Термин «по меньшей мере один» в описании настоящего изобретения эквивалентен термину «несколько», и каждый раз, когда используется один из этих терминов, он означает «один или больше» и наоборот. В некоторых предпочтительных воплощениях термин означает множественность, такое как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, если это допустимо. Специалист в данной области техники понимает, что по причине структурных особенностей молекулы ДНК последовательность ДНК исходного вида может быть в молекуле химерной ДНК фланкирована последовательностями ДНК неисходного вида не более чем с двух концов.

Как понимает специалист в данной области техники, фланкирующие последовательности ДНК занимают положения по сторонам. Таким образом, термин «фланкирующий» в определении настоящего изобретения означает «граничащий» или «прилегающий» или «соприкасающийся» и взаимозаменяем с указанными терминами. Хотя это предполагается в контексте использования термина «фланкирующий» (и любого эквивалентного термина), для ясности явным образом утверждается, что последовательности ДНК исходных видов связаны по меньшей мере с одной фланкирующей последовательностью неисходного вида в одной молекуле ДНК.

Последовательности ДНК неисходных видов представляют собой последовательности ДНК, происхождение которых отличается от исходных видов. Последовательности ДНК неисходных видов могут представлять собой встречающиеся в

природе последовательности ДНК видов, отличающихся от исходных видов, такие как последовательности хромосомной ДНК, таких как видов-хозяев. Альтернативно, последовательности ДНК неисходных видов могут представлять собой искусственные последовательности ДНК, такие как из искусственной конструкции ДНК, например, последовательность ДНК искусственной плазмиды, космиды, фосмиды или искусственной хромосомы. В контексте настоящего изобретения искусственная хромосома может быть выбрана из числа искусственных хромосом дрожжей, грибов или бактерий.

Молекулы химерной ДНК, содержащие последовательности ДНК исходных видов, фланкированные по меньшей мере с одного конца последовательностями ДНК неисходных видов, можно получить методиками, известными специалисту в данной области техники. В соответствии с некоторыми воплощениями, в которых последовательности ДНК исходных видов представляют собой последовательности хромосомной ДНК, а последовательности ДНК неисходных видов представляют собой последовательности из искусственной плазмиды, хромосомную ДНК исходного вида (возможно, совместно с ДНК других частей из всего генома) можно выделить и (случайным образом) фрагментировать, например, (частичным) расщеплением рестриктазами. Расщепленную ДНК исходного вида можно затем лигировать с искусственной плазмидой, полученной при помощи совместимой рестриктазы, что позволит получить популяцию химерных плазмид с различными частичными последовательностями (фрагментами) включенной ДНК исходных видов. Композиции, содержащие такие смешанные популяции плазмид, и сопоставимые или производные композиции, например, где плазида (случайным образом) фрагментирована на фрагменты ДНК, являются воплощениями композиций по изобретению. В соответствии с другими воплощениями, в которых последовательности ДНК исходных видов представляют собой последовательности хромосомной ДНК, а последовательности ДНК неисходных видов также представляют собой последовательности хромосомной ДНК, хромосомную ДНК исходного вида (возможно, совместно с ДНК других частей из всего генома) можно выделить и (случайным образом) фрагментировать, например, (частичным) расщеплением рестриктазами, действием ультразвука или другими видами механической обработки, и фрагментированную ДНК исходного вида можно привести в контакт с клеткой вида-хозяина, компетентного для поглощения и включения чужеродной ДНК в свой геном. Объем научных знаний в отношении горизонтальной (или латеральной) передачи генов между организмами различных видов увеличивается, и, в частности для микроорганизмов, особенно прокариот, показано, что они могут поглощать

и включать чужеродную ДНК в свой геном, включая свою хромосомную ДНК. Дополнительно, транспозируемые элементы (или транспозоны) могут облегчать перенос ДНК между клетками различных видов, и последовательности ДНК исходных видов можно включать в транспозируемый элемент для облегчения включения в геном вида-хозяина. Если в процессе горизонтальной передачи гена чужеродная ДНК включается в ДНК принимающего организма, образуется химерная ДНК, где чужеродная (исходная) ДНК фланкирована ДНК принимающего организма (хозяина). Таким образом, композиции, содержащие такие смешанные популяции организмов-хозяев, включивших в состав своей хромосомной ДНК последовательности ДНК исходных видов, и сопоставимые или производные композиции, например, где хромосомная ДНК вида-хозяина выделена (возможно, совместно с ДНК или другими частями из всего генома) и (случайным образом) фрагментирована на фрагменты ДНК, являются альтернативными воплощениями композиций по изобретению.

Следует понимать, что химерная область молекул химерной ДНК (область, где последовательности ДНК исходных видов соединяются с последовательностями ДНК неисходных видов) может быть очень мала по сравнению с длиной последовательности ДНК исходных видов и (или) последовательности ДНК неисходных видов. Таким образом, при фрагментации молекул ДНК с большой вероятностью может получиться так, что фрагменты ДНК будут содержать только последовательности ДНК исходных видов или последовательности ДНК неисходных видов. То есть количество фрагментов химерной ДНК может быть очень мало.

Исходные виды предпочтительно выбирают так, чтобы полученные из них последовательности фрагментированной ДНК оказывали ингибирующий эффект на целевые виды. Как специалисту в данной области техники ясно из публикации WO2014/020624, ингибирующие в отношении целевых видов фрагменты ДНК можно получить из самих целевых видов или из филогенетически подобных видов. В контексте настоящего изобретения, таким образом, исходные виды могут быть выбраны из целевых видов или из видов, филогенетически подобных целевым видам. Как понимает специалист в данной области техники, термин «ингибирование» в контексте ингибирования целевых видов означает помехи, замедление или даже остановку развития представителей и (или) популяции целевых видов. Можно ожидать, что ингибирующий эффект ингибирующей собственной ДНК работает посредством вмешательства в физиологию целевых видов на клеточном уровне. Термин «собственная ДНК» следует понимать как ДНК вида или филогенетически подобного вида.

Целевые виды могут быть видами, выбранными из растений, грибов, насекомых,

дрожжей, бактерий, архей, водорослей, нематод, клещей, вирусов и протист, предпочтительно, это виды, который могут вызывать вред для здоровья и (или) экономический вред и (или) вред для окружающей среды. Такие целевые виды могут, например, быть видами, связанными с заболеваниями, такими как патогенные и паразитические виды, виды, являющиеся переносчиками инфекции, или они могут быть инвазивными видами или видами, связанными с разрушением продуктов, таких как пищевые, косметические и (или) фармацевтические продукты и (или) другие продукты, содержащие органические вещества. Виды, связанные с заболеваниями, могут вызывать и (или) облегчать распространение заболеваний среди животных, в частности среди людей и (или) сельскохозяйственных животных, или растений, в частности, сельскохозяйственных растений. Инвазивными могут быть любые виды, такие как насекомые, высшие животные или растения, представители которых присутствуют в месте или участке (целевой области) в количестве, большем чем хотелось бы. Инвазивные виды по меньшей мере вызывают неудобства и могут (потенциально) причинять повреждения или вред. Согласно некоторым воплощениям, инвазивные виды могут рассматриваться как сельскохозяйственные вредители. Как понимает специалист в данной области техники, биологические виды могут вызывать разрушение продуктов различными способами. Часто бывает нежелательно даже простое наличие представителей вида, например, в продуктах питания, в частности, если виды могут приводить к нарушению вкуса и (или) производить токсины. Кроме того, преобразования органического вещества продукта могут вести к снижению качества продукта, например, продукт не будет соответствовать спецификации на него, и (или) к (частичной) утрате функций продукта. Специалисту в данной области техники понятно, что термины «виды, связанные с заболеваниями», «патогенные виды», «паразитические виды», «виды, являющиеся переносчиками инфекции», «инвазивные виды» и «виды, связанные с разрушением продуктов» не являются взаимно исключающими, и что между двумя или более этими терминами существует пересечение. Термины используются просто для того, чтобы идентифицировать области, в которых может быть полезно ингибирование целевых видов и в которых предпочтительно используется настоящее изобретение.

Если целевой вид выбран из числа патогенных видов, он может быть выбран из следующих организмов: *Acinetobacter baumannii*, или *Actinomyces israelii*, или *Actinomyces gerencseriae*, или *Propionibacterium propionicus*, или *Trypanosoma brucei*, или ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), или *Entamoeba histolytica*, или виды *Anaplasma*, или виды *Angiostrongylus*, или виды *Anisakis*, или *Bacillus anthracis*, или *Arcanobacterium haemolyticum*, или вирус Junin, или *Ascaris lumbricoides*, или виды *Aspergillus*, или виды

семейства *Astroviridae*, или виды *Babesia*, или *Bacillus cereus*, или виды *Bacteroides*, или *Balantidium coli*, или *Bartonella*, или виды *Baylisascaris*, или BK virus, или *Piedraia hortae*, или виды *Blastocystis*, или *Blastomyces dermatitidis*, или вирус *Machupo*, или *Clostridium botulinum*, или вирус *Sabiá*, или виды *Brucella*, или *Yersinia Pestis*, или *Burkholderia cepacia*, или другие виды *Burkholderia*, или *Mycobacterium ulcerans*, или семейство *Caliciviridae*, или виды *Campylobacter*, или *Candida albicans*, или другие виды *Candida*, или *Capillaria philippinensis*, или *Capillaria aerophila*, или *Bartonella bacilliformis*, или *Bartonella henselae*, или группа A *Streptococcus* spp., или *Staphylococcus* spp., или *Trypanosoma cruzi*, или *Haemophilus ducreyi*, или вирус *Varicella zoster (VZV)*, или *Alphavirus*, или *Chlamydia trachomatis*, или *Chlamydia pneumoniae*, или *Vibrio cholerae*, или *Fonsecaea pedrosoi*, или *Batrachomyxium dendrobatidis*, или *Clonorchis sinensis*, или *Clostridium difficile*, или *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*, или вирус *Colorado tick fever virus (CTFV)*, или *rhinovirus* spp., или коронавирус, или PRNP, или вирус геморрагической лихорадки *Crimean-Congo*, или *Cryptococcus neoformans*, или виды *Cryptosporidium*, или *Ancylostoma braziliense*, или *Cyclospora cayentanensis*, или *Taenia solium*, или *Cytomegalovirus* spp., или вирусы *Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4)*, или *Flavivirus* spp., или green algae, или *Desmodium armatum*, или *Dientamoeba fragilis*, или *Corynebacterium diphtheriae*, или *Diphyllobothrium*, или *Dracunculus medinensis*, или *Ebolavirus (EBOV)*, или виды *Echinococcus*, или виды *Ehrlichia*, или *Enterobius vermicularis*, или виды *Enterococcus*, или виды *Enterovirus*, или *Rickettsia prowazekii*, или *Parvovirus B19*, или *Human herpesvirus 6 (HHV-6)*, или *Human herpesvirus 7 (HHV-7)*, или *Fasciola hepatica*, или *Fasciola gigantica*, или *Fasciolopsis buski*, или PRNP, или надсемейство *Filarioidea*, или *Clostridium perfringens*, или различные виды, или виды *Fusobacterium species*, или *Clostridium perfringens*, или другие виды *Clostridium*, или *Geotrichum candidum*, или *Giardia lamblia*, или *Burkholderia mallei*, или *Gnathostoma spinigerum*, или *Gnathostoma hispidum*, или *Neisseria gonorrhoeae*, или *Klebsiella granulomatis*, или *Streptococcus pyogenes*, или *Streptococcus agalactiae*, или *Haemophilus influenzae*, или энтеровирусы, такие как вирус *Coxsackie A and Enterovirus 71 (EV71)*, или вирус *Sin Nombre*, или вирус *Heartland*, или *Helicobacter pylori*, или *Escherichia coli* O157:H7, O111 и O104:H4, или виды семейства *Bunyaviridae*, или вирус *Hendra*, или вирус *Hepatitis A*, или вирус *Hepatitis B*, или вирус *Hepatitis C*, или вирус *Hepatitis D*, или вирус *Hepatitis E*, или вирус *Herpes simplex virus 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2)*, или *Histoplasma capsulatum*, или *Ancylostoma duodenale* и *Necator americanus*, или *Human bocavirus (HBoV)*, или *Ehrlichia ewingii*, или *Anaplasma phagocytophilum*, или *Human metapneumovirus (hMPV)*, или *Ehrlichia chaffeensis*, или один из папилломавирусов человека, или вирусы парагриппа человека (*HPIV*), или *Hymenolepis nana* и *Hymenolepis diminuta*, или вирус

Epstein–Barr (EBV), или семейство Orthomyxoviridae, или *Isospora belli*, или *Kingella kingae*, или вирус Lassa, или *Legionella pneumophila*, или *Legionella pneumophila*, или виды *Leishmania species*, или *Mycobacterium leprae*, или *Mycobacterium lepromatosis*, или виды *Leptospira*, или *Listeria monocytogenes*, или *Borrelia burgdorferi*, или *Borrelia garinii*, или *Borrelia afzelii*, или *Wuchereria bancrofti*, или *Brugia malayi*, или вирус Lymphocytic choriomeningitis (LCMV), или виды *Plasmodium*, или вирус Marburg, или вирус Measles, или коронавирус респираторного синдрома Ближнего востока, или *Burkholderia pseudomallei*, или *Neisseria meningitidis*, или *Metagonimus yokagawai*, или *Microsporidia* phylum, или вирус *Molluscum contagiosum* (MCV), или вирус Monkeypox virus, или вирус Mumps virus, или *Rickettsia typhi*, или *Mycoplasma pneumoniae*, или *Mycoplasma genitalium*, или *Actinomycetoma* spp., или *Eumycetoma* spp., или *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*, или вирус Nipah, или Norovirus, или *Nocardia asteroides*, или другие виды *Nocardia*, или *Onchocerca volvulus*, или *Opisthorchis viverrini*, или *Opisthorchis felinus*, или *Paracoccidioides brasiliensis*, или *Paragonimus westermani*, или другие виды *Paragonimus*, или виды *Pasteurella*, или *Pediculus humanus capitis*, или *Pediculus humanus corporis*, или *Phthirus pubis*, или *Bordetella pertussis*, или *Yersinia pestis*, или *Streptococcus pneumoniae*, или *Pneumocystis jirovecii*, или Poliovirus, или виды *Prevotella species*, или *Naegleria fowleri*, или вирус JC, или *Chlamydia psittaci*, или *Coxiella burnetii*, или вирус Rabies, или *Borrelia hermsii*, *Borrelia recurrentis*, другие виды *Borrelia*, или вирус Respiratory syncytial virus (RSV), или *Rhinospiridium seeberi*, или Rhinovirus, или виды *Rickettsia species*, или *Rickettsia akari*, или вирус лихорадки Rift Valley, или *Rickettsia rickettsii*, или Rotavirus, или вирус Rubella, или виды *Salmonella*, или коронавирус SARS, или *Sarcoptes scabiei*, или виды *Streptococcus* группы A, или виды *Schistosoma*, или виды *Shigella*, или вирус Varicella zoster virus (VZV), или *Variola major*, или *Variola minor*, или *Sporothrix schenckii*, или виды *Staphylococcus*, или *Strongyloides stercoralis*, или вирус Measles, или *Treponema pallidum*, или виды *Taenia*, или *Clostridium tetani*, или *Trichophyton species*, или *Trichophyton tonsurans*, или *Epidermophyton floccosum*, или *Trichophyton rubrum*, или *Trichophyton mentagrophytes*, или *Trichophyton rubrum*, или *Hortaea werneckii*, или виды *Malassezia*, или *Toxocara canis*, или *Toxocara cati*, или *Toxoplasma gondii*, или *Chlamydia trachomatis*, или *Trichinella spiralis*, или *Trichomonas vaginalis*, или *Trichuris trichiura*, или *Mycobacterium tuberculosis*, или *Francisella tularensis*, или *Salmonella enterica*, или serovar typhi, или *Rickettsia*, или *Ureaplasma urealyticum*, или *Coccidioides immitis*, или *Coccidioides posadasii*, или вирус Venezuelan equine encephalitis, или вирус Guanarito, или *Vibrio vulnificus*, или *Vibrio parahaemolyticus*, или вирус West Nile, или *Trichosporon beigeli*, или *Yersinia pseudotuberculosis*, или *Yersinia enterocolitica*, или вирус желтой лихорадки, или *Zoonospora*

fungus, или вирус Zika, или Mucorales, или Entomophthorales.

Следует понимать, что ингибирование патогенного целевого вида не обязательно должно осуществляться в или на организме животного (включая человека). Вместо этого ингибирование может проводиться и вне контекста организма животного. Например, это может потребоваться для ингибирования целевых видов в культуре (*in vitro*). Предпочтителен выбор патогенных целевых видов из числа топических патогенных и (или) топических целевых видов, в частности, из списка топических патогенных целевых видов, представленного непосредственно выше. Специалист в данной области техники понимает, что термин «топический» в контексте медицины и ветеринарии означает связанный с конкретной поверхностью организма, в частности, с кожей или слизистой оболочкой (слизистой). Таким образом, следует считать, что топические патогенные целевые виды связаны с кожей и (или) ногтями и (или) слизистой оболочкой, включая слизистые оболочки глаз, рта, влагалища, мочевыводящих путей, желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей, включая легкие. Таким образом, термин «топический» не ограничен внешней поверхностью организма животного, но включает ссылку и на внутренние поверхности, такие как легкие и желудочно-кишечный тракт. Топические патогенные целевые виды наиболее предпочтительно представляют собой патогены кожи и (или) ногтей и (или) слизистых оболочек. В контексте настоящего изобретения более предпочтителен выбор патогенных целевых видов из числа архей, бактерий, грибов (включая дрожжи) и протист, в частности, архей, бактерий, грибов (включая дрожжи) и протист из приведенного непосредственно выше списка.

Если целевой вид выбран из числа паразитических видов, он может быть выбран из следующих организмов: *Acanthamoeba* spp., или *Balamuthia mandrillaris*, или *Babesia B. divergens*, или *B. bigemina*, или *B. equi*, или *B. microfti*, или *B. duncani*, или *Balantidium coli*, или *Blastocystis* spp., или *Cryptosporidium* spp., или *Cyclospora cayetanensis*, или *Dientamoeba fragilis*, или *Entamoeba histolytica*, или *Giardia lamblia*, или *Isospora belli*, или *Leishmania* spp., или *Naegleria fowleri*, или *Plasmodium falciparum*, или *Plasmodium vivax*, или *Plasmodium ovale curtisi*, или *Plasmodium ovale Wallikeri*, или *Plasmodium malariae*, или *Plasmodium knowlesi*, или *Rhinosporidium seeberi*, или *Sarcocystis*, или *bovihominis*, *Sarcocystis*, или *suihominis*, или *Toxoplasma gondii*, или *Trichomonas vaginalis*, или *Trypanosoma brucei*, или *Trypanosoma cruzi*, или *Cestoda*, или *Taenia*, или *multiceps*, или *Diphyllobothrium latum*, или *Echinococcus*, или *granulosus*, или *Echinococcus*, или *multilocularis*, или *E. vogeli*, или *E. oligarthrus*, или *Hymenolepis nana*, или *Hymenolepis diminuta*, или *Taenia saginata*, или *Taenia solium*, или *Bertiella mucronata*, или *Bertiella studeri*, или *Spirometra*, или *Erinaceieuropaei*, или *Schistosoma haematobium*, или

Schistosoma japonicum, или *Schistosoma mekongi*, или *Echinostoma echinatum*, или *Trichobilharzia regenti*, или *Schistosomatidae*, или *Ancylostoma*, или *duodenale*, или *Necator*, или *americanus*, или *Angiostrongylus*, или *costaricensis*, или *Anisakis*, или *Ascaris* sp. *Ascaris*, или *lumbricoides*, или *Baylisascaris*, или *procyonis*, или *Brugia malayi*, или *Brugia*, или *timori*, или *Diectophyme renale*, или *Dracunculus*, или *medinensis*, или *Enterobius*, или *vermicularis*, или *Enterobius gregorii*, или *Gnathostoma*, или *spinigerum*, или *Gnathostoma*, или *hispidum*, или *Halicephalobus*, или *gingivalis*, или *Loa loa filaria*, или *Mansonella*, или *Streptocerca*, или *Onchocerca volvulus*, или *Strongyloides*, или *stercoralis*, или *Thelazia*, или *californiensis*, или *Thelazia callipaeda*, или *Toxocara canis*, или *Toxocara cati*, или *Trichinella spiralis*.

Подобно тому, что отмечено в связи с патогенными целевыми организмами, следует понимать, что ингибирование паразитического целевого вида не обязательно должно осуществляться в или на организме животного (включая человека). Вместо этого ингибирование может проводиться и вне контекста организма животного. Например, это может потребоваться для ингибирования целевых видов в культуре. Предпочтителен выбор паразитических целевых видов из числа кожных паразитов и (или) желудочно-кишечных паразитов и (или) паразитов слизистой оболочки, в частности, выбранных из списка, представленного непосредственно выше. Предпочтителен выбор паразитических целевых видов из числа протист или нематод, в частности, протист или нематод из списка, представленного непосредственно выше.

В соответствии с некоторыми воплощениями, целевые виды можно выбрать из видов, патогенных для растений, таких как растительные патогены, выбранные из грибов, оомицетов, бактерий, вирусов, протист или *Fusarium* spp., или *Thielaviopsis* spp., или *Verticillium* spp., или *Magnaporthe* spp., или *Magnaporthe grisea*, или *Sclerotinia* spp., или *Sclerotinia sclerotiorum*, или *Phytophthora* spp., или *Pythium* spp., *Plasmodiophora* spp., или *Spongospora* spp., или *phytopathogenic bacilli*, или *Erwinia* spp., или *Agrobacterium* spp., или *Burkholderia* spp., или *Proteobacteria*, или *Xanthomonas* spp., или *Pseudomonas* spp., или *Phytoplasma* spp., или *Spiroplasma* spp.

Если целевой вид выбран из числа извасивных видов, он может быть выбран из числа сельскохозяйственных вредителей, таких как членистоногие сельскохозяйственные вредители, такие как виды, выбранные из числа следующих организмов: *Acalymma*, или *Acyrtosiphon kondoi*, или *Acyrtosiphon gossypii*, или *Acyrtosiphon pisum*, или *African armyworm*, или *Africanized bee*, или *Agromyzidae*, или *Agrotis ipsilon*, или *Agrotis munda*, или *Agrotis orthogonia*, или *Agrotis porphyricollis*, или *Akkaia taiwana*, или *Aleurocanthus woglumi*, или *Aleyrodes proletella*, или *Alphitobius diaperinus*, или *Alsophila aescularia*, или *Altica chalybea*, или *Anasa tristis*, или *Anisoplia austriaca*, или *Anthonomus pomorum*, или

Anthonomus signatus, или *Aonidiella aurantii*, или *Aonidiella citrina*, или *Aonidiella orientalis*,
или *Apamea apamiformis*, или *Apamea niveivenosa*, или *Aphid*, или *Aphis gossypii*, или *Aphis nasturtii*, или *Apple maggot*, или *Argentine ant*, или *Army cutworm*, или *Fall armyworm*, или
Arotrophora arcuatalis, или *Ash whitefly*, или *Astegopteryx bambusae*, или *Astegopteryx insularis*, или *Astegopteryx minuta*, или *Asterolecanium*, или *Asterolecanium coffeae*, или
Atherigona reversura, или *Athous haemorrhoidalis*, или *Aulacophora*, или *Aulacorthum solani*,
или *Australian plague locust*, или *Bactericera cockerelli*, или *Bactrocera*, или *Bactrocera correcta*, или *Bagrada hilaris*, или *Knulliana*, или *Beet armyworm*, или *Black bean aphid*, или
Blepharidopterus chlorionis, или *Bogong moth*, или *Boll weevil*, или *Bollworm*, или
Brevicoryne brassicae, или *Brown locust*, или *Brown marmorated stink bug*, или *Brown planthopper*, или *Cabbage moth*, или *Cabbage worm*, или *Callosobruchus maculatus*, или
Carrot fly, или *Cerataphis brasiliensis*, или *Ceratitis aliena*, или *Ceratitis andranotobaka*, или
Ceratitis capitata, или *Ceratitis flexuosa*, или *Ceratitis grahami*, или *Ceratitis ovalis*, или
Ceratitis penicillata, или *Ceratitis rosa*, или *Ceratoglyphina bambusae*, или *Ceratopemphigus zehntneri*, или *Ceratovacuna lanigera*, или *Cereal leaf beetle*, или *Chaetosiphon tetrarhodum*,
или *Chlorops pumilionis*, или *Citrus long-horned beetle*, или *Coccus hesperidum*, или *Coccus viridis*, или *Codling moth*, или *Coffee borer beetle*, или *Colias eurytheme*, или *Colorado potato beetle*, или *Common blossom thrips*, или *Confused flour beetle*, или *Cotton bollworm*, или
Crambus, или *Cucumber beetle*, или *Curculio elephas*, или *Curculio nucum*, или *Curculio occidentis*, или *Cutworm*, или *Cyclocephala borealis*, или *Dargida diffusa*, или *Dasineura brassicae*, или *Date stone beetle*, или *Delia (fly)*, или *Delia antiqua*, или *Delia floralis*, или
Delia platura, или *Delia radicum*, или *Dermestes ater*, или *Dermolepida albohirtum*, или *Desert locust*, или *Diabrotica*, или *Diabrotica balteata*, или *Diabrotica speciosa*, или *Diamondback moth*, или *Diaphania indica*, или *Diaphania nitidalis*, или *Diaphorina citri*, или *Diaprepes abbreviatus*, или *Diatraea saccharalis*, или *Differential grasshopper*, или *Diparopsis castanea*,
или *Dociostaurus maroccanus*, или *Drosophila suzukii*, или *Dryocosmus kuriphilus*, или
Dysaphis crataegi, или *Dysmicoccus brevipes*, или *Earias perhuegeli*, или *Epicauta vittata*, или
Epilachna, или *Epitrix cucumeris*, или *Epitrix tuberis*, или *Erionota thrax*, или *Eriosoma lanigerum*, или *Eriosomatinae*, или *Euleia heraclei*, или *Eumetopina flavipes*, или *European corn borer*, или *Eurydema oleracea*, или *Eurygaster integriceps*, или *Ferrisia virgata*, или *Forest bug*, или *Frankliniella tritici*, или *Galleria mellonella*, или *Garden dart*, или *Geoica lucifuga*,
или *Glassy-winged sharpshooter*, или *Greenhouse whitefly*, или *Greenidea artocarpi*, или
Greenidea formosana, или *Greenideoida ceyloniae*, или *Gryllotalpa orientalis*, или *Gryllotalpa vinae*, или *Gypsy moths in the United States*, или *Helicoverpa armigera*, или *Helicoverpa gelotopoeon*, или *Helicoverpa punctigera*, или *Helicoverpa zea*, или *Heliopsis virescens*, или

Henosepilachna, или *Henosepilachna vigintioctomaculata*, или *Henosepilachna vigintioctopunctata*, или Hessian fly, или *Heteronychus arator*, или *Hyalopterus pruni*, или *Hysteroneura setariae*, или *Icerya purchasi*, или *Ipuka dispersum*, или *Jacobiasca formosana*, или *Kaltenbachella elsholtziae*, или *Kaltenbachella japonica*, или Khapra beetle, или *Lampides boeticus*, или Leaf miner, или *Lema daturaphila*, или *Lepidiota consobrina*, или *Lepidosaphes beckii*, или *Lepidosaphes ulmi*, или *Leptocybe invasa*, или *Leptoglossus zonatus*, или *Leptopterna dolabrata*, или Lesser wax moth, или *Leucoptera* (moth), или *Leucoptera coffeina*, или Light brown apple moth, или Light brown apple moth controversy, или *Lipaphis erysimi*, или *Liriomyza huidobrensis*, или *Lissorhoptrus oryzophilus*, или *Lissonotus bonariensis*, или Long-tailed skipper, или *Lygus*, или *Lygus hesperus*, или *Macroductylus subspinosus*, или *Macrosiphoniella pseudoartemisiae*, или *Macrosiphoniella sanborni*, или *Macrosiphum euphorbiae*, или Maize weevil, или *Manduca sexta*, или *Matsumuraja capitophoroides*, или *Mayetiola hordei*, или Mealybug, или *Megacopta cribraria*, или *Melanaphis sacchari*, или *Melittobia australica*, или *Metcalfa pruinosa*, или Mexican bean beetle, или *Micromyzus judenkoi*, или *Micromyzus kalimpongensis*, или *Micromyzus niger*, или Moth, или Leek moth, или *Mythimna unipuncta*, или *Myzus ascalonicus*, или *Myzus boehmeriae*, или *Myzus cerasi*, или *Myzus obtusirostris*, или *Myzus ornatus*, или *Myzus persicae*, или *Nematus*, или *Nematus leucotrochus*, или *Nematus ribesii*, или *Nematus spiraeae*, или *Neomyzus circumflexus*, или *Neotoxoptera oliveri*, или *Nezara viridula*, или Oak processionary, или *Oebalus pugnax*, или Olive fruit fly, или *Ophiomyia simplex*, или *Opisina arenosella*, или *Opomyza*, или *Opomyza florum*, или *Opomyzidae*, или *Orseolia oryzae*, или *Oryzaephilus mercator*, или *Oscinella frit*, или *Ostrinia furnacalis*, или *Oxycarenus hyalinipennis*, или *Papilio demodocus*, или *Paracoccus marginatus*, или *Paratachardina pseudolobata*, или *Paropsisterna selmani*, или *Patanga succincta*, или *Pemphigus betae*, или *Pentalonia nigronervosa*, или *Pentatomoidea*, или *Peridroma saucia*, или *Phorodon humuli*, или *Phthorimaea operculella*, или *Phyllophaga*, или *Phyllotreta nemorum*, или *Phylloxeridae*, или *Phylloxeroidea*, или *Phytomyza horticola*, или *Pieris brassicae*, или Pink bollworm, или *Planococcus citri*, или *Platynota idaeusalis*, или *Plum curculio*, или *Prionus californicus*, или *Pristiphora*, или *Pseudoregma bambucicola*, или *Pseudotheraptus wayi*, или *Psylliodes chrysocephala*, или *Ptinus fur*, или *Pyralis farinalis*, или *Raphidopalpa foveicollis*, или Red imported fire ant, или Red locust, или *Rhagoletis cerasi*, или *Rhagoletis indifferens*, или *Rhagoletis mendax*, или *Rhodobium porosum*, или *Rhopalosiphoninus latysiphon*, или *Rhopalosiphum maidis*, или *Rhopalosiphum padi*, или *Rhopalosiphum rufiabdominale*, или *Rhyacionia frustrana*, или *Rhynchophorus ferrugineus*, или *Rhynchophorus palmarum*, или *Rhynchophorus vulneratus*, или *Rhyzopertha*, или Rice moth, или Russian wheat aphid, или *Saissetia oleae*, или San Jose scale, или Scale insect, или

Schistocerca americana, или *Schizaphis graminum*, или *Schizaphis hypersiphonata*, или *Schizaphis minuta*, или *Schizaphis rotundiventris*, или *Schoutedenia lutea*, или *Sciaridae*, или *Scirtothrips dorsalis*, или *Scutelleridae*, или *Scutiphora pedicellata*, или *Serpentine leaf miner*, или *Setaceous Hebrew character*, или *Shivaphis celti*, или *Silver*, или *Silver leaf whitefly*, или *Sinomegoura citricola*, или *Sipha flava*, или *Sitobion avenae*, или *Sitobion lambersi*, или *Sitobion leelamaniae*, или *Sitobion miscanthi*, или *Sitobion pauliani*, или *Sitobion phyllanthi*, или *Sitobion wikstroemiae*, или *Sitona lepidus*, или *Sitona lineatus*, или *Small hive beetle*, или *Southwestern corn borer*, или *Soybean aphid*, или *Spodoptera cilium*, или *Spodoptera litura*, или *Spotted cucumber beetle*, или *Spotted lanternfly*, или *Squash vine borer*, или *Stemborer*, или *Stenotus binotatus*, или *Strauzia longipennis*, или *Striped flea beetle*, или *Sunn pest*, или *Sweetpotato bug*, или *Synanthedon exitiosa*, или *Tarnished plant bug*, или *Tecia solanivora*, или *Tetranychus urticae*, или другие *Tetranychus spp.*, *Tetraneura nigriabdominalis*, или *Tetraneura yezoensis*, или *Thrips*, или *Thrips angusticeps*, или *Thrips palmi*, или *Thrips simplex*, или *Thrips tabaci*, или *Thysanoplusia orichalcea*, или *Tinocallis kahawaluokalani*, или *Toxoptera aurantii*, или *Toxoptera citricida*, или *Toxoptera odinae*, или *Trichobaris trinotata*, или *Trioza erytrae*, или *Turnip moth*, или *Tuta absoluta*, или *Uroleucon minutum*, или *Varied carpet beetle*, или *Vesiculaphis caricis*, или *Virachola isocrates*, или *Waxworm*, или *Western corn rootworm*, или *Western flower thrips*, или *Wheat fly*, или *Wheat weevil*, или *Whitefly*, или *Winter moth*, или *Xylotrechus quadripes*, или *Zygogramma exclamationis*. В соответствии с некоторыми воплощениями, выбор целевых видов отряда *Lepidoptera* является предпочтительным, в частности, выбор из семейства *Tortricidae*, такой как из рода *Choristoneura*, в частности, из *Choristoneura orae*, *Choristoneura fumiferana* или *Choristoneura freemani*, или выбор из семейства *Noctuidae*, такой как из рода *Spodoptera*, в частности, из *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera litura*, *Spodoptera litoralis*, *Spodoptera cilium*, или *Spodoptera ornithogalli*, или выбор из семейства *Pyalidae*, такой как из рода *Plodia* или *Ephestia*, или выбор из других видов этого отряда, упомянутых в списке непосредственно выше. Виды сельскохозяйственных вредителей могут быть выбраны из видов растительноядных земных членистоногих.

Виды вредителей можно дополнительно выбрать из числа переносчиков инфекций, таких как переносчики инфекций, выбранные из членистоногих. Переносчики инфекций могут участвовать в распространении заболеваний животных, включая человека, или могут переносить заболевания растений. Переносящие заболевания животных переносчики инфекций можно выбрать из числа кровососущих (гематофагов) или лимфососущих членистоногих, предпочтительно кровососущих членистоногих, например, выбранных из семейства *Culicidae*, такие как из рода *Aedes*, или из семейства

Ceratorogonidae, такие как из рода *Culicoides*, или из семейства Tabanidae, или из семейства Simuliidae, такие как из рода *Austrosimulium*, или из семейства Glossinidae, такие как из рода Glossina, или из семейства Triatominae, такие как из рода *Triatoma infestans* или *Rhodnius prolixus*, или из семейства Siphonoptera, такие как из рода Publicidae, или из семейства Phthiraptera, такие как из рода *Pediculus*, или из семейства Ixodidae, такие как из рода Argasidae.

Членистоногие переносчики, участвующие в распространении заболеваний растений, могут быть выбраны из числа следующих организмов: Acyrthosiphon pisum, или Agromyzidae, или Anastrepha grandis, или Anastrepha obliqua, или Anthomyiidae, или Aphids, или Bark beetles, или Beet leafhoppers, или Brevicoryne brassicae, или Cacopsylla melanoneura, или Cacopsylla ulmi, или Ceratitidis podocarpi, или Chaetosiphon fragaefolii, или Cicadulina, или Cicadulina mbila, или Common brown leafhopper, или Cryptococcus fagisuga, или Curculionidae, или Diabrotica balteata, или Empoasca decedens, или Eumetopina flavipes, или Euscelis plebejus, или Frankliniella tritici, или Glassy-winged sharpshooter, или Haplaxius crudus, или Hyalesthes obsoletus, или Hylastes ater, или Leaf beetle, или Leafhopper, или Lipaphis erysimi, или Macrosteles quadrilineatus, или Mealybug, или Melon fly, или Molytinae, или Pegomya hyoscyami, или Pissodes, или Pissodes strobi, или Pissodini, или Planthopper, или Pseudococcus maritimus, или Pseudococcus viburni, или Psylla pyri, или Psyllidae, или Rabdophaga clavifex, или Rhynchophorus palmarum, или Scaphoideus titanus, или Scirtothrips dorsalis, или Silverleaf whitefly, или Tephritidae, или Thripidae, или Thrips palmi, или Tomicus piniperda, или Toxoptera citricida, или Treehopper, или Triozidae, или Western flower thrips, или Xyleborus glabratus.

В соответствии с некоторыми предпочтительными воплощениями, виды вредители выбраны из видов нематод, паразитирующих на растениях, в частности, выбраны из рода Meloidogyne, например, M. arenaria, M. incognita, M. javanica или M. hapla, или выбраны из рода Heterodera, например, Heterodera glycines, или Heterodera avenae и H. filipjevi, или выбраны из рода Globodera, например, Globodera pallida, или G. rostochiensis, или выбраны из рода Pratylenchus, например, P. penetrans, P. thornei, P. neglectus, P. zeae, P. vulnus или P. coffeae, или выбраны из рода Radopholus, например, Radopholus similis.

В соответствии с некоторыми воплощениями, инвазивные виды могут быть выбраны из сорняков. Виды сорняков, считающиеся целевыми видами по настоящему изобретению, например, представляют собой виды сорняков, выбранные из следующих организмов: Alismataceae, или Apiaceae, или Asteraceae, или Amaranthaceae, или Cactaceae, или Caryophyllaceae, или Chenopodiaceae, или Caulerpaceae, или Commelinaceae, или Poaceae, или Portulacaceae, или Euphorbiaceae, или Fabaceae (Leguminosae), или Rubiaceae,

или Hydrocharitaceae, или Azollaceae, или Salviniaceae, или Iridaceae, или Liliaceae, или Pontederiaceae, или Melastomataceae, или Myrtaceae, или Polygonaceae, или Lygodiaceae, или Rosaceae, или Acanthaceae, или Orobanchaceae, или Scrophulariaceae, или Convolvulaceae, или Cuscutaceae, или Solanaceae, или Sparganiaceae.

Специфические виды сорняков, считающиеся целевыми видами, могут быть выбраны из числа следующих организмов: *Sagittaria sagittifolia* Linnaeus, или *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier, или *Ageratina adenophora* (Spreng.) King & H.E. Robins., или *Ageratina riparia* (Regel) King & H.E. Robins., или *Arctotheca calendula* (L.) Levyns, или *Carthamus oxyacanthus* M. Bieberstein, или *Crupina vulgaris* Cass., или *Inula britannica* L., или *Mikania cordata* (Burm. f.) B.L. Robins., или *Mikania micrantha* Kunth, или *Onopordum acaulon* L., или *Onopordum illyricum* L., или *Senecio inaequidens* DC., или *Senecio madagascariensis* Poir., или *Tridax procumbens* L., или *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. ex DC., или *Opuntia aurantiaca* Lindley, или *Drymaria arenarioides* Humboldt & Bonpland, или *Salsola vermiculata* L., или *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh, или *Commelina benghalensis* L., или *Avena sterilis* Linnaeus, или *Chrysopogon aciculatus* (Retz.) Trin., или *Digitaria abyssinica* (A. Rich) Stapf, или *Digitaria velutina* (Forsk.) Beauv., или *Imperata brasiliensis* Trinius, или *Imperata cylindrica* (L.) Beauv., или *Ischaemum rugosum* Salisbury, или *Leptochloa chinensis* (L.) Nees, или *Nassella trichotoma* Hackel ex Arech., или *Oryza longistaminata* A. Chev. & Roehr., или *Oryza punctata* Ktze. ex Steud., или *Oryza rufipogon* Griffiths, или *Paspalum scrobiculatum* Linnaeus, или *Pennisetum clandestinum* Hochst. ex Chiov., или *Pennisetum macrourum* Trinius, или *Pennisetum pedicellatum* Trinius, или *Pennisetum polystachion* (Linnaeus) Schultes, или *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. Clayton, или *Saccharum spontaneum* L., или *Setaria pumila* ssp. *pallidifusca* (Schumacher) B.K. Simon, или *Urochloa panicoides* Beauvois, или *Euphorbia terracina* L., или *Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Delile, или *Galega officinalis* L., или *Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvalle, или *Mimosa pigra* L., или *Prosopis alata* R. A. Philippi, или *Prosopis argentea* Burkart, или *Prosopis articulata* S. Watson, или *Prosopis burkartii* Muñoz, или *Prosopis caldenia* Burkart, или *Prosopis calingastana* Burkart, или *Prosopis campestris* Griesbach, или *Prosopis castellanosi* Burkart, или *Prosopis denudans* Benth., или *Prosopis elata* (Burkart) Burkart, или *Prosopis farcta* (Banks & Soland.) J.F. Macbr., или *Prosopis ferox* Griesbach, или *Prosopis fiebrigii* Harms, или *Prosopis hassleri* Harms ex Hassler, или *Prosopis humilis* Gillies ex Hooker & Arnott, или *Prosopis kuntzei* Harms ex Hassler, или *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth, или *Prosopis palmeri* S. Watson, или *Prosopis reptans* Benth., или *Prosopis rojasiana* Burkart, или *Prosopis Ruizlealii* Burkart, или *Prosopis ruscifolia* Griesbach, или *Prosopis sericantha* Gillies ex Hook. & Arn., или *Prosopis strombulifera* (Lamarck)

Bentham, или *Prosopis torquata* (Cavan. ex Lagasca y Segura) DC., или *Spermacoce alata* Aubl., или *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle, или *Lagarosiphon major* (Ridley) Moss, или *Ottelia alismoides* (Linnaeus) Pers., или *Azolla pinnata* R. Brown, или *Salvinia auriculata* Aublet, или *Salvinia biloba* Raddi, или *Salvinia herzogii* de la Sota, или *Salvinia molesta* D. S. Mitchell, или *Moraea collina* Thunb., или *Moraea flaccida* (Sweet) Steud., или *Moraea miniata* Andrews, или *Moraea ochroleuca* (Salisb.) Drapiez, или *Moraea pallida* (Baker) Goldblatt, или *Asphodelus fistulosus* Linnaeus, или *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth, или *Monochoria hastata* (L.) Solms, или *Monochoria vaginalis* (Burm. f.) K. Presl ex Kunth, или *Melastoma malabathricum* L., или *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) Blake, или *Emex australis* Steinhall, или *Emex spinosa* (Linnaeus) Campdera, или *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. (1801) (Mobot), или *Lygodium microphyllum* (Cav.) R. Br., или *Rubus fruticosus* L., или *Rubus moluccanus* L., или *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anders., или *Aeginetia* spp. L., или *Alectra* spp. Thunb., или *Orobanche* spp. (nonnative) L., или *Limnophila sessiliflora* (Vahl) Blume, или *Striga* spp. Lour., или *Ipomoea aquatica* Forssk., или *Cuscuta* spp. L., или *Lycium ferocissimum* Miers, или *Solanum tampicense* Dunal, или *Solanum torvum* Sw., или *Solanum viarum* Dunal, или *Sparganium erectum* L.

Выбираемые в качестве целевых организмов виды, которые вызывают разрушение продуктов, могут быть выбраны из вызывающих порчу микроорганизмов, таких как выбранных из числа бактерий, таких как Грам-отрицательные палочки, например, *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp., Грам-положительные спорообразующие бактерии, например, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., молочно-кислые бактерии и другие Грам-положительные бактерии, например, *Brochothrix* spp, *Micrococcus* spp. или *Enterobacteriaceae*, грибы, такие как *Zygomycetes* из рода *Penicillium*, из рода *Aspergillus*, или дрожжи, такие как *Zygosaccharomyces* spp, *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Dekkera* (*Brettanomyces*) spp. Альтернативно, целевые виды, вызывающие разрушение продуктов, могут быть выбраны из микроскопических клещей в хранящихся продуктах, таких как выбранные из числа *Astigmata*, таких как выбранные из числа *Glycyphagidae* или *Carpoglyphidae*.

В соответствии с некоторыми предпочтительными воплощениями композиции по изобретению, композиция содержит клетки нескольких видов, видов-хозяев, отличающихся от исходных видов, где молекулы ДНК находятся в клетках видов-хозяев.

Как уже упоминалось выше, термин «виды-хозяева» используется просто для определения. В контексте настоящего изобретения виды-хозяева в целом представляют собой виды, отличающиеся от исходных видов, предпочтительно, это филогенетически несходные виды, и в них включены последовательности ДНК исходных видов. В

соответствии с некоторыми воплощениями филогенетически несходные (отдаленные) виды представляют собой виды других таксономических отрядов, таких как другие классы, другие филумы, другие царства или другие домены. В соответствии с некоторыми воплощениями филогенетически несходные виды представляют собой виды других семейств, таких как другие отряды, другие классы, другие филумы, другие царства или другие домены. Виды-хозяева можно выбрать из любых видов, способных принимать и реплицировать чужеродную ДНК исходных видов, в частности, фрагменты ДНК исходных видов, таких как фрагменты исходных видов, включенные в векторы клонирования и (или) экспрессии. Как ясно из описания, не обязательно, чтобы представитель вида-хозяина принимал и реплицировал весь геном исходного вида. Вместо этого на ингибирующий эффект собственной ДНК, оказываемый на целевой вид, можно повлиять, используя большое количество клеток и (или) индивидуумов вида-хозяина, где, соответственно, различные клетки и (или) индивидуумы реплицируют различные части генома исходного вида, как это происходит в библиотеке ДНК. Таким образом, одна клетка популяции клеток вида-хозяина содержит только часть всех последовательностей ДНК исходного вида, присутствующей в композиции. Виды-хозяева можно, например, выбрать из многоклеточных организмов или из микроорганизмов. Например, в качестве клеток вида-хозяина можно использовать клетки многоклеточного растения. Как понимает специалист в данной области техники, ДНК исходных видов можно ввести в клетки многоклеточного растения различными способами, включая бомбардировку частицами (баллистическую трансфекцию), например, культур эмбриональных клеток, опосредуемую агробактериями трансформацию, опосредуемую вирусными векторами трансформацию. Если в качестве вида-хозяина используется растение, виды хозяева могут быть выбраны из числа сельскохозяйственных культур, предпочтительно, пищевых сельскохозяйственных культур, таких как выбранные из злаковых, кукурузы, сахарной свеклы, рапса, гороха, сои, масличных культур, таких как рапс, эфиопская горчица, подсолнечник, крахмальные культуры, такие как (сладкое) сорго, волокнистые культуры, такие как лен или конопля, лигноцеллюлозные культуры, такие как тростник канареечник, тростник гигантский, просо, мискантус, кардон, лесные культуры с коротким оборотом, например, ива, тополь или эвкалипт.

Альтернативно, в качестве видов-хозяев можно использовать гельминтов, применяемых в терапии гельминтами, таких как *Trichuris suis*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis diminuta*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis* или *Hymenolepis nana*. Используемые в качестве видов-хозяев виды гельминтов, предпочтительно, представляют собой мутуалистичные для людей виды, в

частности, *Trichuris suis*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura* или *Hymenolepis diminuta*. Для видов нематод наблюдались случаи горизонтального переноса генов (см, помимо прочего, PLoS Negl Trop Dis. 2007 Oct; 1(1): e35; doi: 10.1371/journal.pntd.0000035), и горизонтальный перенос генов для терапевтических гельминтов с целью включения ДНК исходных видов в их геномы.

В соответствии с другими альтернативными воплощениями, виды-хозяева выбраны из микроорганизмов. Как знает специалист в данной области, микроорганизм представляет собой микроскопический организм, который может быть одноклеточной формой или может существовать в виде колонии клеток. В контексте настоящего изобретения микроорганизмы предпочтительно выбраны из прокариот, таких как археи или бактерии, или из эукариот, таких как грибы (включая дрожжи) или микрофиты (микроводоросли). Выбираемые из микроорганизмов виды-хозяева могут быть выбраны из таких микроорганизмов, которые выращивают в жидкой культуре, таких как *E. coli*, в частности, штамм DH5 α или производный от него, или штамм DH10B или производный от него, или из видов сахаромицетов, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, таких как штамм AB1380 или производный от него, или из видов аспергилл, таких как *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* или *Aspergillus nidulans*, или из видов палочковидных бактерий, или из видов псевдомонад, или из молочнокислых бактерий, таких как *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp. или *Streptococcus* spp., или из цианобактерий, таких как виды *Arthrospira*, в частности *Arthrospira plantensis* или *Arthrospira maxima*. В соответствии с некоторыми воплощениями, микроорганизм может быть организмом, характеризующимся статусом «признанный в целом безопасным» (Generally Regarded as Safe (GRAS)) согласно FDA. Альтернативно, в качестве видов-хозяев можно использовать микроорганизмы почвы, предпочтительно смешанные культуры или различные почвенные бактерии и (или) грибы. Используемые в качестве видов-хозяев микроорганизмы почвы могут быть выбраны из Alphaproteobacteria spp., Betaproteobacteria spp., Deltaproteobacteria spp., Actinobacteria spp., Thermoleophilia spp., Rubrobacteria spp., Chloracidobacteria spp., Acidobacteria spp. или Solibacteres spp. В соответствии с некоторыми предпочтительными воплощениями виды хозяева выбраны из биоконтролирующих агентов, например, энтомопатогенных биоконтролирующих агентов, таких как микробиологические биоконтролирующие агенты, в частности, бактериальные биоконтролирующие агенты, такие как *Bacillus thuringiensis* или *Bacillus subtilis*, или грибковые биоконтролирующие агенты, такие как *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium* spp. или *Metarhizium* spp. Биоконтролирующие агенты могут быть альтернативно выбраны, например, из *Trichoderma* spp. или *Ampelomyces quisqualis*. Виды-

хозяева могут быть дополнительно выбраны из микробиологических стимуляторов роста растений, таких как виды *Bacillus*, виды *Trichoderma* или виды *Mycorrhiza*. В соответствии с некоторыми высокопредпочтительными воплощениями, если вид хозяин является микробиологическим энтомопатогенным биоконтролирующим агентом, целевые виды являются членистоногими, предпочтительно, членистоногими, выбранными из членистоногих вредителей сельского хозяйства, или членистоногими переносчиками, участвующими в распространении заболеваний растений. Конкретные примеры организмов этих групп были представлены выше.

Как уже разъяснялось, в воплощениях, когда последовательности ДНК исходных видов включены в клетку-хозяина, последовательности ДНК исходных видов либо включены в искусственные реплицируемые конструкции ДНК, такие как искусственная плаزمиды или искусственная хромосома, вводимые в клетки вида-хозяина, либо включены в природный геном клеток вида-хозяина. Путем этого включения последовательностей ДНК исходных видов в искусственные конструкции ДНК, вводимые в клетки-хозяева или в природный геном клеток-хозяев, последовательности ДНК исходных видов могут быть реплицированы механизмом репликации ДНК клеток-хозяев совместно с репликацией ДНК видов-хозяев. Удивительное открытие авторов настоящего изобретения, заключающееся в том, что фрагменты ингибирующей ДНК видов остаются ингибирующими, если они ассоциированы с ДНК (производственных) видов-хозяев, открыло новые возможности производства и презентации само-ингибирующих фрагментов ДНК.

Включение последовательностей ДНК в конструкции ДНК и введение конструкций ДНК в клетки-хозяева стало стандартной практикой в различных областях биологических наук. Так, специалист в области техники может легко применить эти методики в настоящем изобретении. Дополнительно, стало известно, что различные организмы могут захватывать молекулы ДНК из своего окружения и могут включать эти молекулы в свой природный геном. В частности, микроорганизмы, в особенности прокариот, от природы способны к такому горизонтальному или латеральному переносу генов. Дополнительно, некоторые известные методики генной инженерии, такие как баллистическая трансфекция, основаны на включении фрагментов ДНК в природный геном клеток, таких как растительные клетки.

Дополнительно, транспозируемые элементы (или транспозоны) могут облегчать перенос ДНК между клетками различных видов.

Предпочтительно, чтобы охват генома исходных видов в смеси молекул ДНК был в диапазоне 20-100%, таком как 20-90%, 30-100%, 30-90%, 40-100%, 40-90%, 50-100%, 50-

90%, предпочтительно 60-100%, таком как 60-90%, 70-100%, 70-90%, 80-100%, 80-90%. На основании сделанных авторами экспериментальных наблюдений, можно сделать вывод, что в этих диапазонах наблюдается хорошая ингибирующая активность последовательностей ДНК исходных видов в составе композиции по изобретению. Опытный специалист знает и понимает, что охват генома исходного вида в смеси молекул ДНК коррелирует с процентом последовательности ДНК исходных видов, в частности, последовательности хромосомной ДНК, которая присутствует в цельной (популяции) молекул ДНК в составе композиции. С учетом экспериментальных результатов о том, что фракция общего генома носит ингибирующий характер, можно ожидать, что (фрагментированные) последовательности кДНК, которые также представляют фракцию всей последовательности ДНК генома, будет проявлять ингибирующую активность в отношении видов, из которых они получены, или в отношении филогенетически подобных видов. Однако предпочтительно, чтобы последовательности ДНК исходных видов содержали некодирующие последовательности; если последовательности ДНК исходных видов содержат достаточное количество таких некодирующих последовательностей, на основании доступных знаний по хромосомной организации, можно ожидать более высокую видоспецифичность в некодирующих последовательностях. С учетом этого предпочтительно, чтобы последовательности ДНК исходных видов содержали случайным образом фрагментированную хромосомную ДНК.

При репликации последовательностей ДНК исходных видов в (химерных) молекулах ДНК клеток видов-хозяев последовательности ДНК исходных видов будут ассоциированы со значительным количеством последовательностей ДНК исходных видов и, возможно, со значительным количеством последовательностей ДНК искусственных конструкций ДНК. К своему удивлению авторы настоящего изобретения обнаружили, что последовательности ДНК исходных видов сохраняют свою само-ингибирующую активность в случае их ассоциации с относительно большим количеством этих последовательностей ДНК неисходных видов. Таким образом, удаление ДНК и (или) последовательностей ДНК исходных видов искусственных конструкций из композиции не является обязательным. В соответствии с некоторыми предпочтительными воплощениями, композиция по изобретению, таким образом, содержит ДНК неисходных видов, причем ДНК неисходных видов находится в избытке, по сравнению с ДНК исходных видов, предпочтительно, таком что отношение ДНК неисходных видов к ДНК исходных видов находится в диапазоне от 10:1 до 1000:1, таком как от 20:1 до 500:1, от 50:1 до 500:1, или от 100:1 до 500:1. ДНК неисходных видов содержит и предпочтительно состоит из последовательностей ДНК видов-хозяев (обязательно) и последовательностей

ДНК искусственных конструкций ДНК (необязательно), таких как векторы клонирования и (или) экспрессии, например, выбранные из плазмид, ВАС, УАС или искусственных грибковых хромосом.

Исходные виды предпочтительно выбирают так, чтобы полученные из них последовательности ингибирующей ДНК ингибировали целевые виды, как рассмотрено выше. Как ясно специалисту в данной области из публикации WO2014/020624, последовательности ингибирующей ДНК можно получить из самих целевых видов или из филогенетически подобных видов. В контексте настоящего изобретения исходный вид можно, таким образом, выбрать из целевых видов или из видов, филогенетически подобных целевым.

В контексте настоящего изобретения филогенетически подобный вид представляет собой вид, имеющий похожий геном. Опытный специалист в данной области техники понимает, что филогенетически близкородственные виды характеризуются более похожим геномом, чем филогенетически отдаленные виды. Таким образом, термин «филогенетически подобный» означает характеризующейся близким филогенетическим родством. Таким образом, филогенетическое подобие можно определить на основании известного филогенетического родства. Таким образом, в соответствии с некоторыми предпочтительными воплощениями, филогенетически подобные виды представляют собой виды того же таксономического отряда. В рамках определенного отряда филогенетически подобные виды предпочтительно относятся к одной монофилетической группе (кладе), такой как одно семейство, одно подсемейство, одна триба, одна подтриба, один род. Наиболее предпочтительно, чтобы филогенетически подобные виды относились к одному таксономическому семейству, такому как одна триба, одна подтриба, один род.

Дополнительно, методики определения сходства (или родства) геномов легко доступны. Например, подобие геномов можно определить по кинетике ренатурации/реассоциации фрагментов одноцепочечной ДНК (оцДНК) геномов обоих видов. Альтернативно или дополнительно, можно изучить денатурацию (плавление) фрагментов двухцепочечной ДНК (дцДНК), ренатурировавших из смеси фрагментов оцДНК геномов обоих видов. Последняя методика позволяет определить температуру плавления T_m , то есть температуру, при которой половина цепей ДНК находится в состоянии оцДНК, а также связанную T_{50H} . Подходы, включающие изучение кинетики ренатурации/денатурации и профили плавления, возникли в начале 70-х годов (см. de Ley et al. Eur J Biochem. 1970 Jan;12(1):133-42) для определения родства бактерий, но эти же подходы, включающие анализ профиля температуры плавления, также применяли для определения родства эукариот (см., например, Sibley и Ahlquist, J Mol Evol (1984) 20:2-15).

Кроме того, как известно из публикации WO2014/020624, филогенетическое подобие видов можно определить на основании того, являются ли ингибирующие фрагменты ДНК одного вида также ингибирующими для другого вида. В соответствии с некоторыми другими воплощениями, филогенетически подобные виды, таким образом, представляют собой виды, ДНК которых, полученная случайной фрагментацией выделенной цельной ДНК или случайным синтезом фрагментов, начиная от цельной ДНК, ингибирует целевые виды. Специалисту в данной области ясно, что на основании этого функционального определения филогенетику можно определить, проводя тесты, подобные описанным в WO2014/020624, и в ходе приведенных там экспериментов. В рамках одного таксономического отряда исходные виды будут также филогенетически подобны целевым видам, потому что ДНК, полученная из исходных видов методом случайной фрагментации выделенной общей ДНК или методом случайного синтеза фрагментов, начиная от общей ДНК, ингибирует целевые виды.

Композиция по изобретению предназначена для ингибирования целевых видов. Указанные целевые виды могут быть идентичны исходным видам или могут быть видами, филогенетически подобными исходным. Для усиления ингибирования целевых видов композицию можно комбинировать с применением множества других (природных) биоцидов, таких как (природные) пестициды, например, фунгициды, инсектициды, нематоциды, митициды, артропоциды, бактерициды или алгициды. Дополнительные (природные) биоциды могут быть микробиологическими биоконтролирующими агентами, например, бактериальные биоконтролирующие агенты или грибковые биоконтролирующие агенты, в частности, энтомопатогенные биоконтролирующие агенты. В соответствии с некоторыми воплощениями, в составе композиции представлены дополнительные (природные) биоциды. Если дополнительный (природный) биоцид представляет собой микробиологический биоконтролирующий агент, такой как энтомопатогенный биоконтролирующий агент, предпочтительно, чтобы жизнеспособные клетки микробиологического биоконтролирующего агента функционировали как клетки-хозяева, содержащие и реплицирующие ДНК исходного вида. Например, исходный вид может быть выбран из целевых видов или из видов, филогенетически подобных целевым видам, где целевые виды выбраны из *Lepidoptera*, в частности, выбраны из семейства *Tortricidae*, например, из рода *Choristoneura*, в частности из *Choristoneura orae*, *Choristoneura fumiferana* или *Choristoneura freeman*, или выбраны из семейства *Noctuidae*, например, из рода *Spodoptera*, в частности из *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera litura*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera ciliata* или *Spodoptera ornithogalli*, или выбраны из семейства *Pyralidae*, например, из рода *Plodia* или *Ephestia*, или из *Diptera*, *Coleoptera* или

Hymenoptera, и наиболее предпочтительно, выбраны из рода *Choristoneura*. Композиция может также дополнительно содержать биоконтролирующий агент, направленный против целевых видов, такой как бактериальный биоконтролирующий агент, например, *Bacillus thuringiensis* или *Bacillus subtilis*, или грибковый биоконтролирующий агент, например энтомопатогенный гриб, такой как *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium* spp. или *Metarhizium* spp. Биоконтролирующий агент может быть жизнеспособной биомассой бактериального биоконтролирующего агента или грибкового биоконтролирующего агента, предпочтительно биомассой *Bacillus thuringiensis*. Указанная жизнеспособная биомасса, такая как клетки *Bacillus thuringiensis*, может также содержать ДНК исходных видов, включенная в реплицируемую форму, и, тем самым, функционировать как клетки видов-хозяев.

Композицию можно вводить целевому виду любыми пригодными средствами, такими как контакт с поверхностью, цитотропное введение, системное введение при помощи, например, инъекции, проглатывания или вдыхания или адсорбции. Композицию можно смешать в форме (в случае лечения сухими или жидкими препаратами), выбранной из группы, состоящей из дисперсии, например, в форме аэрозоля, суспензии, увлажняемых или растворимых порошков, эмульсий в воде или других растворителях, диспергируемых гранул, суспензий микрокапсул, эмульсифицируемых концентратов, жидких паст, макроэмульсий, дисперсий в масле, прикормки. Можно использовать системы растворителей, содержащие воду или глубокие эвтектические растворители (deep eutectic solvent (DES)), такие как природные глубокие эвтектические растворители (NADES).

Определение диапазонов концентраций, в которых ДНК композиции по изобретению оказывает ингибирующее воздействие на целевые виды, находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Специалист понимает, что требуемая концентрация может зависеть от таких факторов, как активность ДНК композиции по ингибированию целевых видов, требуемый уровень ингибирования, применяется ли дополнительный биоцид и (или) схема введения целевым видам. Для многих применений подходящая концентрация может быть в диапазоне 1-1500 м.д., таком как 2-1300 м.д., 2-1000 м.д., 5-1000 м.д., 10-1000 м.д., 50-1000 м.д., 100-1000 м.д., 200-1000 м.д., 500-1000 м.д. Для других применений могут потребоваться более высокие концентрации. Как следует из WO2014/020624, ингибирующие фрагменты ДНК могут использоваться в медицине. Помимо прочего, WO2014/020624 демонстрирует ингибирование *Aspergillus niger*, который может вызывать такие инфекции, как отомироз. Аналогично композицию по настоящему изобретению, содержащую фрагменты ДНК или

их предшественники, можно использовать в медицине для ингибирования *Aspergillus niger* или других паразитических и (или) патогенных организмов, таких как паразиты-нематоды. При медицинском применении композиций ДНК исходного вида является ингибирующим агентом или его предшественником, так что, если она находится в нефрагментированной форме, она может фрагментироваться *in situ*, например, в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, дополнительный аспект изобретения заключается в композиции по изобретению для использования в медицине, или, иными словами, для использования в качестве медикамента. Медицинские применения в контексте настоящего изобретения связаны с медициной для людей и (или) с ветеринарией, предпочтительно, с медициной для людей. Ссылка на животное в контексте настоящего изобретения включает ссылку на человека, если из контекста не следует другое значение. Композиция может, например, применяться в медицине в качестве противопатогенной композиции, способной ингибировать распространение и (или) рост патогенных организмов или даже убивать патогенные организмы. Патогенные целевые организмы, которые могут быть ингибированы композицией по изобретению, например, представляют собой топоческие патогены, кишечные патогены, легочные патогены или системные патогены. Патоген может, например, быть микробиологическим патогеном, таким как выбранный из бактерий, грибов или вирусов, паразитом, таким как выбранный из протист или из гельминтов, например, нематоды, ленточные черви, плоские черви или круглые черви. Медицинское применение композиции по изобретению, в частности, направлено против патогенных и (или) паразитических целевых видов, описанных выше в обсуждении композиции по изобретению, в частности, это топоческие патогены и (или) патогены, ассоциированные с кожей, ногтями или слизистой оболочкой. Для использования в качестве медикамента композиция находится в фармацевтически приемлемой форме.

Дополнительный аспект изобретения связан с применением композиции по изобретению в качестве продукта для ингибирования целевых видов. Целевые виды могут соответствовать исходным видам или видам, филогенетически подобным исходным видам. В продукте композиция по изобретению может использоваться в качестве действующего вещества для ингибирования целевых видов. Предполагаемое ингибирование целевых видов может происходить в продукте, например, с целью повышения биологической стабильности продукта, или, альтернативно, предполагаемое ингибирование целевых видов может происходить на целевой поверхности или в целевой области, где следует применять продукт. Продукт может содержать дополнительные ингредиенты, включая дополнительные ингредиенты, ингибирующие паразитические,

патогенные и инвазивные виды, такие как один или более ингредиентов, выбранных из следующих: биоциды, гербициды, фунгициды, инсектициды, акарициды, нематоциды, антипротозойные вещества, альгициды, бактерициды. Продукт может представлять собой медицинский продукт или может быть немедицинским продуктом. В соответствии с некоторыми воплощениями, продукт представляет собой немедицинский продукт, такой как продукт для сельского хозяйства, персональный лекарственный препарат или санитарный продукт, такой как мыло или детергент.

В соответствии с некоторыми предпочтительными воплощениями применения композиции, последовательности ДНК исходных видов могут содержаться в клетках видов-хозяев в составе молекул химерной ДНК. Для некоторых применений достаточно ввести молекулы химерной ДНК в клетки видов-хозяев, поскольку они могут высвобождаться из клеток видов-хозяев в условиях, действию которых подвергают клетки видов-хозяев. Например, если продукт предназначен для ингибирования целевых видов, для которых клетки видов-хозяев являются подходящим источником питания, молекулы химерной ДНК, содержащие последовательности ДНК исходных видов, высвобождаются из клеток видов-хозяев в тонком кишечнике целевых видов после их поедания целевыми видами. В этом процессе последовательности ДНК исходных видов могут также высвобождаться из молекул химерной ДНК. Кроме того, в процессе естественного распада клеток видов-хозяев содержащиеся в клетках видов-хозяев молекулы химерной ДНК могут высвобождаться из клеток видов-хозяев, и последовательности ДНК исходных видов могут высвобождаться их молекул химерной ДНК путем их фрагментации. При альтернативном использовании изобретения клетки видов хозяев разрушают способами разрушения клеток, такими как методы разрушения клеток, фрагментирующие ДНК, и материал из разрушенных клеток видов-хозяев используется для ингибирования целевых видов. С этой целью ДНК можно выделить из разрушенных клеток видов-хозяев известными способами. Альтернативно, масса разрушенных клеток может использоваться для ингибирования целевых клеток без дальнейшего выделения ДНК.

Дополнительный аспект изобретения относится к способу производства композиции по изобретению. Способ включает в себя следующие этапы:

- получение нескольких-хозяев;
- получение источника ДНК из исходных видов, необязательно, содержащих фрагментированную ДНК исходных видов;
- воздействие на клетки видов-хозяев, содержащие источник ДНК исходных видов, условий, позволяющих клеткам видов-хозяев захватить ДНК исходных видов в реплицируемой форме;

- размножение клеток видов-хозяев, содержащих ДНК исходных видов в реплицируемой форме;
- необязательно, выделение клеток видов-хозяев, содержащих ДНК исходных видов в реплицируемой форме;
- необязательно, выделение ДНК из клеток видов-хозяев, в частности, ДНК, содержащую ДНК исходных видов;
- необязательно, фрагментация ДНК видов-хозяев, в частности, ДНК, содержащую ДНК исходных видов

На первом этапе способа получают несколько видов-хозяев. На основании информации, обсуждавшейся в связи с описанием композиции по изобретению, использования изобретения и доступных общих распространенных знаний, специалист в данной области знает и понимает, как предоставить подходящие клетки видов-хозяев.

На втором этапе получают источник ДНК из исходных видов, возможно содержащий фрагментированную ДНК. Можно использовать любой подходящий источник ДНК исходных видов. Например, можно использовать клетки исходных видов как таковые. Альтернативно, можно использовать ДНК, высвобождающееся из клеток исходных видов. например, ДНК, высвобождающееся из клеток, поврежденных методиками повреждения клеток, такими как приводят к фрагментированию ДНК. Высвобождающуюся ДНК можно выделять, а можно и не выделять. Выделенную ДНК можно фрагментировать, а можно и не фрагментировать. Фрагментированную ДНК исходных видов можно представить как таковую или включенной в искусственные конструкции ДНК, такие как искусственная плазида, космида, искусственные хромосомы, такие как YAC или BAC, или искусственные грибковые хромосомы, а также включенной в сконструированные молекулы химерной ДНК, ассоциированной с транспозируемыми элементами.

На третьем этапе на клетки видов-хозяев, содержащие ДНК исходных видов, воздействуют условиями, позволяющими клеткам видов-хозяев захватить ДНК исходных видов в реплицируемой форме. Захватывая ДНК исходных видов в реплицируемой форме, клетки видов-хозяев реплицируют ДНК исходных видов механизмами репликации ДНК. Таким образом, условия должны быть такими, чтобы полученная ДНК исходных видов включалась в клетки видов-хозяев так, чтобы она была функционально доступна механизмам репликации ДНК клеток видов-хозяев и, тем самым могла реплицироваться. Специалист в данной области техники сможет выбрать подходящие условия, позволяющие клеткам видов-хозяев захватить ДНК исходных видов в реплицируемой форме.

Например, если ДНК исходных видов представлена в составе искусственных конструкций ДНК, таких как плазмиды, космиды, искусственные хромосомы или сконструированные молекулы химерной ДНК, ассоциированные с транспозируемыми элементами, специалист в данной области техники понимает, каким предварительным обработкам следует подвергнуть клетки вида-хозяина, чтобы сделать их компетентными для эффективного захвата этих искусственных конструкций ДНК, так чтобы их можно было бы эффективно реплицировать.

В случае, если ДНК исходного вида представлено как клетки исходного вида, специалист в данной области понимает, что требуемые условия должны позволять клеткам исходного вида высвобождать ДНК исходного вида и фрагментироваться ДНК исходного вида. Обнаружено, что в процессе разложения компоста создаются такие условия, что ДНК входящего в компост растительного исходного материала может быть трансфицирована в микробиому почвы. На основании этих результатов специалист в данной области может ожидать, что также и ДНК нерастительных исходных видов, входящая в состав компоста или аналогичного разлагающегося биологического материала, может попадать в микробиому почвы. Таким образом, подходящие условия могут быть условиями разложения компоста, в частности, если виды-хозяева представляют собой микроорганизмы почвы, такие как выбранные из *Alphaproteobacteria* spp., *Betaproteobacteria* spp., *Deltaproteobacteria* spp., *Actinobacteria* spp., *Thermoleophilia* spp., *Rubrobacteria* spp., *Chloracidobacteria* spp., *Acidobacteria* spp. или *Solibacteres* spp.

В случае, если ДНК исходного вида представлена как ДНК, высвобождающаяся из клеток исходного вида, специалист в данной области техники понимает, что высвобождающаяся ДНК исходного вида может быть захвачена подходящими клетками вида-хозяина в ходе естественных процессов или посредством форсированных методов, таких как баллистическая трансфекция (или метод «генной пушки»).

Четвертый этап является необязательным и содержит этап выделения клеток видов-хозяев. Из настоящего описания, включая примеры, специалист в данной области понимает, что выделение клеток видов-хозяев не является обязательным для всех применений. Если выделение клеток видов-хозяев требуется или желательно, специалист в данной области имеет достаточно знаний подходящих методов выделения клеток видов-хозяев.

Пятый этап также является необязательным и содержит этап выделения ДНК из клеток видов-хозяев. Из настоящего описания, включая примеры, специалист в данной области понимает, что выделение ДНК из клеток видов-хозяев не является обязательным для всех применений. Если выделение ДНК из клеток видов-хозяев требуется или

желательно, специалист в данной области имеет достаточно знаний подходящих методов выделения ДНК из клеток видов-хозяев.

Шестой этап является еще одним необязательным этапом и содержит этап фрагментирования ДНК клеток видов-хозяев. Из настоящего описания, включая примеры, специалист в данной области понимает, что фрагментирование ДНК клеток видов-хозяев не является обязательным для всех применений. Если фрагментирование ДНК видов-хозяев требуется или желательно, специалист в данной области имеет достаточно знаний подходящих методов фрагментирования ДНК клеток видов-хозяев. Если ДНК видов-хозяев фрагментируют, предпочтительно фрагментировать молекулы химерной ДНК. Предпочтительно для фрагментирования ДНК использовать методы статистического фрагментирования ДНК.

Изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими экспериментами.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ

ЭКСПЕРИМЕНТ 1

Библиотеки *Arabidopsis thaliana*

Коммерческие микробиологические геномные библиотеки *Arabidopsis thaliana* закупили в TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), они были сконструированы как в дрожжах, так и в *E. coli*. Библиотека YAC CD4-21P представляла собой объединенную геномную библиотеку дрожжевых искусственных хромосом (pooled yeast artificial chromosome (YAC)) в составе вектора pYAC4; ДНК выделили из растений Columbia; первоначальная библиотека состояла из 1152 геномов; средний размер вставки 420 т.п.о.; 21% клонов содержат ДНК хлоропластов; библиотека содержит 81 пул; ферменты клонирования: EcoRI и EcoRI.

Библиотека BAC CD4-21P представляла собой бинарную геномную библиотеку космид в составе вектора POCA18-hyg; получена из фрагментов геномной ДНК из Wassilewskija (Ws) методом частичного гидролиза с TaqI; представляет десять геномных эквивалентов; вектор содержит ген устойчивости к гигромицину под контролем промотора CaMV 35S; ферменты клонирования ClaI и ClaI.

Каждую библиотеку использовали для получения микробиологического раствора следующим образом:

Библиотека YAC CD4-21P:

Каждый из 80 стоков библиотеки инокулировали в пробирку, содержащую среду YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% бактопептона, 1% глюкозы), и инкубировали при 28°C в течение 48 часов. После инкубации пробирки объединили, клеточные суспензии

центрифугировали (4000 об/мин, 5 мин) и ресуспендировали в 10 мл 0,9% NaCl (объединенная дрожжевая суспензия). Затем объединенную культуру YAC перенесли в настольный реактор с перемешиванием (New Brunswick), содержащий 1 л среды YPD, при 28°C, 300 об/мин, скорость аэрации 1 об/об/мин. Реактор инокулировали адекватной аликвотой объединенной дрожжевой суспензии с получением начальной $O.P_{500} = 0,1$. Через 48 часов биомассу дрожжей собрали, промыли и ресуспендировали в дистиллированной воде с достижением финальной концентрации 50 мг сухой массы клеток на мл.

Для получения дрожжевых клеток, используемых в качестве контроля, следовали той же процедуре, но с использованием в качестве инокулята для биореактора предварительной культуры штамма *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D в среде YPD. Кроме того, в этом случае произведенную биомассу собирали, промывали и ресуспендировали в дистиллированной воде до достижения той же плотности клеток, что была указана выше.

Библиотека BAC CD4-21P:

Каждый из 80 стоков библиотеки инокулировали в пробирку, содержащую триптон-соевый бульон (Tryptone Soya Broth (TSB)) с 50 мг*мл⁻¹ гигромицина, и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. После инкубации пробирки объединили, клеточные суспензии центрифугировали (10000 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в 10 мл 0,9% NaCl (объединенная бактериальная суспензия). Затем культуру бактериальной библиотеки перенесли в настольный реактор с перемешиванием (New Brunswick), содержащий 1 л среды TSB с гигромицином, при 37°C, 200 об/мин, скорость аэрации 1 об/об/мин. Реактор инокулировали адекватной аликвотой объединенной дрожжевой суспензии с получением начальной $O.P_{500} = 0,01$. Через 48 часов бактериальную биомассу собрали, промыли и ресуспендировали в дистиллированной воде с достижением плотности клеток 50 мг сухой массы клеток на мл.

Для получения бактериальных клеток, используемых в качестве контроля, следовали той же процедуре, но с использованием в качестве инокулята для реактора предварительной культуры штамма *Escherichia coli* ATCC 10536 в TSB. Кроме того, в этом случае произведенную биомассу собирали, промывали и ресуспендировали в дистиллированной воде до достижения той же плотности клеток, что была указана выше.

Анализ ингибирования

Микробиологические растворы двух библиотек подвергали действию ультразвука, и полученные клеточные гомогенаты инкубировали в аэробных условиях при комнатной температуре в течение 15 дней, компенсируя испарение воды добавлением дистиллированной воды. Затем различные аликвоты гомогенатов разбавили в

соотношении 1:1, 1:10 и 1:100 дистиллированной водой и увлажнили ими фильтровальную бумагу в чашках Петри в трех повторностях с 10 растениями на каждый уровень концентрации. Саженьцы *Arabidopsis thaliana* приготовили, высаживая семена в чашки Петри со стандартным питательным раствором на фильтровальной бумаге. Для использования в анализе ингибирования выбрали здоровые саженцы одинакового размера возрастом не менее одной недели. Эксперимент проводили, подвергая саженцы воздействию различных растворов в чашках Петри (100 семян на чашку, 10 чашек на обработку). В качестве контроля исследовали саженцы, к которым на протяжении эксперимента прибавляли только дистиллированную воду. Обработка заключалась в воздействии либо библиотеки, либо соответствующего микробиологического раствора без геномной библиотеки. Выживание саженцев анализировали через 10 дней, пересчитывая количество живых растений. Эксперимент проводили в вегетационной камере, поддерживаемой на оптимальном уровне температуры и влажности.

Результаты

Результаты анализа ингибирования продемонстрировали ингибирующий эффект смесей гетерологичной и собственной ДНК при исследовании влияния микробиологических библиотек (BAC и YAC) геномов *Arabidopsis thaliana* на конспецифическое выживание саженцев. Действительно, выживание саженцев было значительно ниже при действии YAC и BAC-библиотек геномной собственной ДНК, по сравнению с обоими контролями, обработанными дистиллированной водой, и с соответствующими микробиологическими растворами, включая гетерологичную ДНК, но не геномную библиотеку собственной ДНК (Фиг. 1). Этот профиль был согласованным на протяжении трех уровней разведения при обработке. Более того, обработка, содержащая гетерологичную ДНК, но не собственной ДНК, обычно не влияла на выживание саженцев, которое не отличалось от контроля, за исключением материала *S. cerevisiae*, который продемонстрировал неспецифический ингибирующий эффект при более высоком уровне концентрации.

ЭКСПЕРИМЕНТ 2

Библиотека *Cyperus aesculentus*

Геномную BAC-библиотеку *Cyperus aesculentus* сконструировали в компании Bio S&T (Монреаль, Канада) в *E. coli* EPI300, используя вектор pSmart-HindIII (устойчивость к хлорамфениколу). Библиотеку объединили на одном 96-луночном планшете, причем каждая лунка содержала 124 первичных клон, всего 11 808 клонов (> 2 x геномное покрытие). Средний размер вставки (110 Т.п.о.) определили, используя протестированные

статистические клоны, расщепленные NotI. Библиотеку хранили при -80°C .

Библиотеку использовали для получения микробиологического раствора, приготовленного следующим образом:

Для амплификации каждую лунку инокулировали материалом из замороженного стока в пробирке, содержащей триптон-соевые бульон (TSB) с хлорамфениколом в концентрации 12,5 мг/л, и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. После инкубации объединили 96 пробирок, клеточную суспензию центрифугировали (10000 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в 10 мл 0,9% NaCl (объединенная бактериальная суспензия). Затем культуру бактериальной библиотеки перенесли в настольный реактор с перемешиванием (New Brunswick), содержащий 1 л среды TSB с хлорамфениколом, при 37°C , 200 об/мин, скорость аэрации 1 об/об/мин. Реактор инокулировали адекватной аликвотой объединенной дрожжевой суспензии с получением начальной $\text{O.P.}_{500} = 0,01$. Через 48 часов бактериальную биомассу собрали, промыли и ресуспендировали в дистиллированной воде с достижением плотности клеток 50 мг сухой массы клеток на мл.

Для получения бактериальных клеток, используемых в качестве контроля, следовали той же процедуре, но с использованием в качестве инокулята для реактора предварительной культуры штамма *Escherichia coli* EPI300 в TSB. Кроме того, в этом случае произведенную биомассу собирали, промывали и ресуспендировали в дистиллированной воде до достижения той же плотности клеток, что была указана выше.

Анализ ингибирования

Микробиологические растворы подвергали действию ультразвука, и полученные клеточные гомогенаты инкубировали в аэробных условиях при комнатной температуре в течение 15 дней, компенсируя испарение воды добавлением дистиллированной воды. Затем различные аликвоты гомогенатов разбавили в отношении 1:10 и 1:100 об/об каждым из двух различных субстратов роста растений (кварцевый песок и стандартная почвенная горшочная смесь). Саженьцы *Cyperus aesculentus* приготовили, высаживая семена в чашки Петри со стандартным питательным раствором на фильтровальной бумаге. Для использования в анализе ингибирования выбрали здоровые саженьцы одинакового размера возрастом не менее 10 дней. Эксперимент проводили, подвергая саженьцы воздействию различных субстратных смесей в небольших пластиковых горшках объемом 15 мл (1 саженец на горшок, 20 горшков на обработку). Обработка включала факторную комбинацию типов субстрата (два уровня, либо песок, либо горшочная земля), тип материала *E. coli* (два уровня, либо с ВАС-библиотекой, либо без нее) и концентрацию раствора (два уровня, 1:10 или 1:100). Горшки, содержавшие несмешанный субстрат, считались контролем (10 горшков на каждый тип субстрата). Рост *C. aesculentus*

в контролируемых условиях (температура днем/ночью 22/16°C, световой период 16:8 часов, влажность окружающей среды, ежедневное увлажнение до естественной влагоемкости горшка) анализировали через 10 дней после высевания саженцев в горшки методом деструктивного сбора растительного материала с последующей сушкой в печи (60° С x 48 часов) и взвешиванием общей биомассы.

Результаты

Результаты анализа ингибирования продемонстрировали ингибирующий эффект ВАС-геномной библиотеки *Cyperus aesculentum* на конспецифический рост саженцев. Действительно, биомасса саженцев была значительно ниже при действии ВАС-библиотеки геномной собственной ДНК, по сравнению с обоими контролями, обработанными дистиллированной водой, и с соответствующим микробиологическим материалом, включая гетерологичную ДНК, но не геномную библиотеку собственной ДНК (Фиг. 2). Ингибирующий эффект зависел от дозы, он был согласованным на двух уровнях концентрации при обработке. Обработка, содержащая гетерологичную ДНК, но не собственной ДНК, не влияла на рост саженцев, который не отличался от контроля.

ЭКСПЕРИМЕНТ 3

Библиотека *Caenorhabditis elegans*

Библиотеку фосмид *C. elegans* приобрели (коммерчески доступна) в компании Source BioScience (<http://www.sourcebioscience.com>) Библиотека включала 41 x 384 планшетов всего с 15744 клонами. Большая библиотека вставок (средний размер 43,3 т.п.о.) была сконструирована в *E. coli* EPI300-T1R с использованием вектора фосмиды CoryControl pCC1FOS (устойчивость к хлорамфениколу).

Использовали два штамма *E. coli*: OP50 and EPI300-T1R. Штаммы *E. coli* вырастили в среде роста LB. При необходимости в среду роста прибавляли хлорамфеникол в итоговой концентрации 12,5 мкг/мл и арабинозу в итоговой концентрации 0,01% м/о. Штамм *C. elegans* был дикого типа Bristol (N2). Штамм *C. elegans* поддерживали на NGM агаровых планшетах при 20°C (без арабинозы), на которые распределяли *E. coli* OP50 в качестве источника питания. В качестве источника питания на NGM планшетах (с арабинозой) использовали *E. coli* EPI300-T1R и EPI300-T1R, трансформированные библиотекой, основанной на pCC1FOS, как указано.

Для амплификации фосмиды каждый планшет для микротитрования, содержащий 384 клон библиотеки, инокулировали замороженным стоком на LB агаровых планшетах, содержащих хлорамфеникол (чашки Петри 150 мм). Полученный 41 планшет инкубировали при 37°C в течение ночи. После инкубации бактерии собрали в 12 мл

бульона LB, содержащего хлорамфеникол, распределили по каждому планшету при помощи шпателя. Полученную бактериальную смесь перенесли в 15 мл культуральные пробирки (41 пробирка). 100 мкл инокулировали в 4 мл бульона LB, содержащего хлорамфеникол и арабинозу, и инкубировали в течение ночи при 37°C (41 пробирка). На следующий день 100 мкл бактериальной культуры перенесли в 2 мл бульона LB, содержащего хлорамфеникол и арабинозу, и инкубировали в течение ночи при 37°C (41 пробирка).

Анализ ингибирования

Полученные 41 бактериальные культуры объединили и 20 мкл этих объединенных бактерий использовали на каждом планшете NGM, содержащем арабинозу (35 мм). В качестве отрицательного контроля использовали нетрансформированные *E. coli* EPI300-T1R. В этом случае бактерии выращивали по такой же процедуре, что и для амплификации фосмид, но не использовали хлорамфеникол. Для скрининга I поколения одного червя *C. elegans* стадии L4 перенесли на каждый планшет NGM, содержащий арабинозу и инокулированный бактериями, затем хранили при 20°C. Этого червя переносили каждые 12 часов на свежий идентичный планшет, чтобы дать ему возможность отложить все яйца (3 дня).

Отслеживали следующие параметры: смертность эмбрионов (отношение числа нежизнеспособных яиц к числу отложенных яиц) и поврежденные фенотипы (отношение числа поврежденных фенотипов к числу отложенных яиц). Те же параметры отслеживали и при скрининге II поколения, для которого одного не имеющего дефектов червя *C. elegans* стадии L4 из поколения I переносили на каждый планшет NGM, содержащий арабинозу и инокулированный бактериями, после чего обрабатывали, как описано выше для скрининга поколения I.

Анализировали также ингибирование с использованием фракции генома *C. elegans*. С этой целью червей кормили клоном cloneA01(WRM0610aA01) (хромосома I; начало клона: 13249863 – конец клона: 13287543 [размер 37680]) библиотеки *C. elegans*, клоном cloneB01(WRM0610cA02) (хромосома X; начало клона: 12671842 - конец клона: 12705840 [размер 33998]) библиотеки *C. elegans* и комбинацией cloneA01 и cloneB01. У потомков первого поколения исследовали смертность эмбрионов (отношение числа нежизнеспособных яиц к числу отложенных яиц) и число нарушений фенотипа (отношение числа поврежденных фенотипов к числу отложенных яиц).

Результаты

В ходе эксперимента одиннадцать червей кормили EPI300-T1R, содержащей целую фосмидную библиотеку *C. elegans*, и двенадцать червей кормили нетрансформированным

EPI300-T1R, всех этих червей проанализировали в ходе скрининга поколения I (2574 и 3055 яиц, соответственно). Черви, питавшиеся EPI300-T1R, содержащей целую фосмидную библиотеку *C. elegans*, показали повышение смертности эмбрионов, значительно отличающейся от червей, питавшихся EPI300-T1R (3,85% и 0,82% соответственно, $p < 0,0001$). Отношение числа самцов к числу отложенных яиц не менялось в ходе обработки, так как самцы в обоих потомствах отсутствовали. Значимо более высокая частота дефектов развития (6,32%) наблюдалась в потомстве червей, получавших EPI300-T1R, содержащей целую библиотеку фосмид *C. elegans*, по сравнению с потомством червей, получавших EPI300-T1R ($p < 0,0001$, Фиг. 3).

Следует отметить, что негативные эффекты библиотеки фосмид *C. elegans* были усилены в поколении II, по сравнению с поколением I (Фиг. 3).

Результаты ингибирования фракцией генома представлены в таблице 2 ниже.

	КлонA01 ⁽¹⁾	КлонB01 ⁽²⁾	КлонA01 + Клон B01 ⁽³⁾
Смертность эмбрионов	0,29 %	0,77%	4,8%
Поврежденный фенотип	1,09%	0,2%	1,81%

(1) кормили 5 червей, анализ 1378 яиц; (2) кормили 5 червей, анализ 1299 яиц; (3) кормили 12 червей, анализ 2726 яиц. % значения представляют значимые различия, по сравнению с контролем

Результаты показывают, что небольшая фракция генома оказывает значимые эффекты на смертность эмбрионов и наличие поврежденных фенотипов. Совместно клоны оказывают повышенный эффект (более, чем аддитивный). Можно ожидать, что при комбинировании с дополнительными клонами ингибирующий эффект может прогрессивно увеличиться.

ЭКСПЕРИМЕНТ 4

Библиотека *Spodoptera littoralis*

Геномную ВАС библиотеку *S. littoralis* (хлопковая совка) сконструировали в *E. coli* DH10B с помощью вектора CopyControl pCC1BACH (BamH I Hind III, EcoR I Cloning Ready Vector – 8128 п.о.) в центре Hind III после экстракции и расщепления (рестриктаза Hind III) высокомолекулярной геномной ДНК из зародышей *S. littoralis*, выращенных в лаборатории и затем замороженных. Клоны вырастили на планшетах, содержащих твердый субстрат Luria Bertani (LB) + хлорамфеникол и отобрали. Клоны скринировали и взяли образцы, индуцировали экспрессию до большого числа копий, а затем перенесли в лунки 96-луночного глубоколоночного планшета. Каждая лунка содержала 290 первичных клонов, всего 27840 клонов ($>10 \times$ покрытие генома). Средний размер вставки (132 т.п.о.) определили с использованием исследуемых взятых случайным образом клонов,

расщепляемых NotI. Приготовили также контроль с пустым вектором и вырастили его в тех же условиях, что и вектор библиотеки. Вектор библиотеки и пустой вектор хранили при -80°C.

Библиотеку использовали для получения ДНК плазмиды следующим образом: одну стерильную зубочистку погрузили и смочили в культуре каждой отдельной лунки, после чего инокулировали в микроцентрифужной пробирке вместимостью 2 мл, содержащей 1 мл LB с хлорамфениколом (12,5 мкг/мл). После инокуляции микроцентрифужные культуры инкубировали при 37°C, при орбитальном встряхивании в течение ночи. Все 96 первоначальных культур (96 мл) объединили, получив первоначальный инокулят, репрезентативный для всей библиотеки. Приготовили 10 л LB с хлорамфениколом, разделили его по стеклянным колбам Эрленмейера и стерилизовали. Каждого получателя субстрата инокулировали первоначальным инокулятом и инкубировали при 37°C при орбитальном встряхивании в течение ночи.

Для экстракции ДНК плазмиды из библиотеки и пустого контрольного вектора использовали набор QIAGEN Plasmid Giga Kit согласно инструкциям производителя. Концентрация полученной ДНК составила 688 нг/мкл для библиотеки около 800 мкл (общий выход ДНК = 550 мкг) и 268 нг/мкл для пустого вектора.

Анализ ингибирования

Личинок *Spodoptera littoralis* на третьей личиночной стадии держали в контролируемых условиях (температура 22-24°C, световой период 16:8 часов) в чашках Петри диаметром 15 см и кормили как ранее описано (Bergomaz и Voppré, 1986). Обработка включала растворы фрагментов ДНК, полученные из лосося (*Salmo salar*) и *S. littoralis* путем экстракции и воздействия ультразвука, как описано в работе Mazzoleni et al. (2015b), а также смесь собственной- и гетерологичной ДНК, полученной экстракцией из ВАС библиотеки, как описано выше.

Каждый из трех растворов для обработки разбавили до концентрации ДНК 200 нг/мкл, и 4 мл каждого раствора включили в суточное питание личинок. Двадцать повторов каждого вида обработки (чашки Петри, каждая с 30 личинками) поддерживали в контролируемых условиях в течение 20 дней с начала эксперимента по изучению роста. Повторы контроля (N = 10) также поддерживали в тех же условиях и кормили стандартной необработанной пищей. Выживание личинок анализировали через 20 дней периода роста.

Результаты

Результаты эксперимента 4 показали, что выживание личинок *Spodoptera littoralis* в значительной степени подвержено воздействию собственной ДНК посредством

проглатывания, как в присутствии, так и в отсутствии гетерологичной ДНК (то есть, ДНК штамма микроорганизмов, используемого в качестве вектора ВАС библиотеки) в составе гранул для питания. Действительно, в этих двух случаях наблюдали частоту выживания 5% и 0% через 20 дней (Фиг. 4). Напротив, если гранулы для питания содержали исключительно гетерологичную ДНК (то есть, ДНК лосося), значимого снижения выживания не наблюдалось по сравнению с необработанным контролем, демонстрируя, что одна только гетерологичная ДНК не индуцирует ингибирующих эффектов у личинок (Фиг. 4).

ЭКСПЕРИМЕНТ 5

В подтверждающем эксперименте для дополнительного подтверждения результатов описанных выше экспериментов о том, что фрагментированная собственная ДНК оказывает ингибирующее воздействие на представителей видов, если представлена совместно с гетерологичной ДНК (например, ДНК организма-хозяина, используемого для амплификации ДНК), исследовали ингибирование *Drosophila melanogaster* при помощи собственной ДНК, полученной в ходе амплификации в дрожжах, подходящем источнике питания для *D. melanogaster*.

Амплификация собственной ДНК

Культуру *Drosophila Melanogaster* получили стандартным вскармливанием. Содержащие фрагменты ДНК *D. melanogaster* дрожжевые клетки сконструировали в Bio S&T (Монреаль, Канада). Для этого всю ДНК, выделенную из представителей культуры *D. melanogaster*, частично расщепили с помощью Sau3AI. Фрагменты расщепившейся ДНК клонировали в векторе pGADT7 с использованием центра клонирования BamHI. Клетки-хозяева *E. coli* DH10B трансформировали векторами pGADT7, содержащими клонируемые фрагменты *Drosophila Melanogaster*, и полученную библиотеку амплифицировали на среде агара в течение ночи. Около 120 000 оригинальных клонов перенесли в большие чашки Петри (всего 10 чашек) на жидкой среде. Затем колонии отмыли и собрали в 10 пробирок. Для выделения библиотеки ДНК выполнили процедуру *maxi-prep*.

ДНК, выделенную из библиотеки *E. coli*, затем использовали для трансформации клеток-хозяев *S. cerevisiae* Y187. Библиотеку амплифицировали на агаровой среде в течение ночи и около 120 000 оригинальных клонов перенесли в большие чашки Петри (всего 10 чашек) на жидкой среде. Затем колонии отмыли и собрали в 10 пробирок. Размер вставки определили на 10 случайно выбранных клонов методом гель-хроматографии, средний размер оказался равен 4 т.п.о., диапазон 1 – 6 т.п.о.

Анализ ингибирования

Библиотеку дрожжей использовали в качестве компонента стандартной пищи *Drosophila* (Sang (1978)) от стадии яиц до куколки. Воздействие было следующим: обработка собственной ДНК: включение в питание дрожжевой библиотеки; контроль 1: включение в питание той же дрожжевой библиотеки без вектора, в качестве контроля; контроль 2: включение в питание той же дрожжевой библиотеки с пустым вектором. Результаты представлены в таблице 3 ниже.

Таблица 3. Ингибирование ранних стадий жизни *D. Melanogaster* при помощи фрагментированной собственной ДНК в составе дрожжевой библиотеки.

	Продолжительность стадии (дни)		Смертность (%)	
	Личинка (3-я стадия)	Куколка	Личинка (3-я стадия)	Куколка
Контроль 1	9	6	6 ($n=100$)	0 ($n=94$)
Дрожжевая библиотека	18	13	40 ($n=100$)	50 ($n=60$)

Результаты показывают значимое ингибирование личинок, которых кормили дрожжевой библиотекой, содержащей ДНК дрозофилы. В ходе роста личинок наблюдали значимое удлинение времени развития (в два раза больше контроля) и увеличение смертности (40% на третьей личиной стадии и 83% для куколки). Различий между контролем 1 со стандартным питанием и контролем 2, питавшимся дрожжами с пустым вектором библиотеки, не наблюдали, это означает, что ингибирование (определенное на уровне продолжительности стадии жизни и смертности) вызвано включением ДНК дрозофилы в дрожжевую библиотеку.

ЭКСПЕРИМЕНТ 6

Ингибирование *Pinus halepensis* и *Populus nigra*

На основании эффективного ингибирования целевых видов при помощи (фракции) фрагментов собственной ДНК, включенных в искусственные конструкции ДНК, реплицирующиеся в организме-хозяине, можно ожидать, что собственная ДНК, включенная в природный геном вида-хозяина, будет также эффективна при ингибировании целевых видов. Как известно, латеральная передача генов широко встречается в природе, включая микроорганизмы почвы.

Для подтверждения ингибирования целевых видов при помощи собственной ДНК,

включенной в природный геном видов-хозяев, в данном эксперименте с организмами почвы два различных материала компоста (листья *Pinus halepensis* и *Populus nigra*) инокулировали микроорганизмами почвы, взятыми из почвы дубовой рощи, в которой оба вида отсутствуют. Разложившийся компост использовали в анализе ингибирования, как описано в работе Mazzoleni et al. 2015. Разложившийся материал компоста, показавший конспецифичное ингибирование, использовали для метагеномного анализа ДНК микробиомы с целью подтверждения интеграции растительной ДНК в ДНК микробиомы почвы.

Подробнее, свежие листья *P. halepensis* и *P. nigra* собрали в поле и использовали в эксперименте по разложению следующим способом. Свежесрезанные листья собрали в природных сообществах, разместив сети под wybranymi случайным образом растениями ($n > 20$), высушили при комнатной температуре в проветриваемой камере до достижения постоянной массы и хранили при комнатной температуре. Эксперимент по разложению выполнили в камере роста с оптимальной доступностью воды и следующими температурными условиями: компост увлажняли каждые 7 суток до максимальной емкости дистиллированной водой, и температура была $18 \pm 2^\circ\text{C}$ ночью и $24 \pm 2^\circ\text{C}$ днем. Компост из сухих листьев (100 г каждого вида в трех повторях) поместили на пластиковые подносы (размером 30 x 50 x 50 см). Микробиологический инокулят, собранный в дубовой роще, где два вида отсутствовали, приготовили и распространили согласно Bonanomi et al. (2011). Компост собрали через 120 дней инкубации и высушили в бумажных пакетах (при 40°C до достижения постоянной массы).

Чтобы подтвердить видоспецифический ингибирующий эффект разложившегося компоста, выполнили следующий биоанализ: полоски стерильной фильтровальной бумаги шириной 8 см поместили в квадратные чашки Петри (размер 12 x 12 x 1,5 см). Предварительно пророщенные семена каждого вида (по пять на каждую чашку) поместили в верхней части бумажных полосок, на которые ранее добавили различные распавшиеся материалы компоста. Для наблюдения корней чашки наклонили под углом 45° и накрыли непрозрачными листами. Длину корней анализировали через 28 дней.

Чтобы выделить популяцию микроорганизмов из разложившегося материала, 1 г образца компоста поместили в пробирки вместимостью 5 мл. К каждому образцу прибавили 3 мл фосфатного буферного физиологического раствора (PBS). Образцы гомогенизировали вихревыми движениями в течение 60 секунд и затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 1 минуты, выделяя клетки микроорганизмов из мусора компоста. После центрифугирования надосадочные растворы отделенных клеток микроорганизмов перенесли в новые пробирки вместимостью 2 мл. После фазы

смешивания ДНК выделили из клеток микроорганизмов способом СТАВ. В конце этапа экстракции образцы обработали поливинилпирролидоном (PVP) с целью удаления фенолов во избежание возможного ингибирования ПЦР. Экстрагированную ДНК дополнительно очистили этанолом, после чего высушили в ламинарном микробиологическом шкафу и элюировали в воде качества для ПЦР без нуклеаз.

Метагеномный анализ разложившегося компоста выполнили стандартными способами дробного секвенирования. Результаты считывания спаренных концевых фрагментов в ходе исследования метагеномики затем проанализировали в соответствии с описанной ниже процедурой биоинформатики, обнаружив рекомбинантные фрагменты обоих микробиологических видов и ДНК видов растений в разложившемся компосте.

Чтобы найти возможные фрагменты рекомбинантной ДНК, принадлежащие обоим описанным выше растениям и видам соответствующих микробиом, использовали следующую процедуру. Парно-концевые прочтения ДНК из экспериментов по метагеномике объединили при помощи функции `BBmerged BBmap` (Bushnell 2016), опцию `kmers` использовали, чтобы уменьшить число ложно-положительных результатов (значение параметров `extend2=20`, `iterations=5`). Не объединившиеся парно-концевые прочтения сливали при помощи функции `fuse.sh BBmap` (Bushnell 2016), вводя `ON` между считыванием вперед и обратно. Объединенные и слитые прочтения затем выравнивали с геномом хозяина для сравнения или с геномом родственных видов, если геном был недоступен, используя программу `BLASTn` (Camacho et al. 2009). Использовали следующие геномы сравнения: *Pinus taeda* (1760464 каркасов ~22 Гп.о.) и *Populus trichocarpa* (1694 каркаса, ~500 Мегабаз). Все прочтения, для которых наблюдалось хотя бы одно «попадание» в геном хозяина, считались соответствующими. Прочтения, соответствующие геному хозяина, независимо выравнивали с не-избыточной базой данных NCBI с использованием алгоритма `BLASTn` (Camacho et al., 2009), чтобы подтвердить соответствие видам сравнения.

Результаты

Эксперименты по биоанализу подтвердили видоспецифический ингибирующий эффект разложившегося компоста на *P. halepensis* и *P. nigra*. Рост корней пророщенных семян *P. halepensis* был на 50% меньше на своем собственном компосте, по сравнению с компостом *P. nigra*. Рост корней пророщенных семян *P. nigra* был на 70% меньше на своем собственном компосте, по сравнению с компостом *P. halepensis*.

Анализ данных метагеномики разложившегося компоста четко показал наличие нескольких фрагментов рекомбинантной ДНК между видами растений и микробиологических организмов. Начиная от 44 431 532 слитых прочтений, 108 288

слитых прочтений соответствует геномному каркасу *Pinus taeda*. 108 288 прочтений затем сравнили с базой данных нуклеотидов (NT) NCBI, и для 100% из них нашли хотя бы одно соответствие в базе данных NT со 41 533 уникальными идентификаторами (ID). Среди всех уникальных ID мы сделали случайную выборку 10 000 ID, чтобы получить детализированную аннотацию таксонов. Из общего количества соответствующих последовательностей (108 288) аннотации были подтверждены для подмножества 29 149 последовательностей, где для 4595 последовательностей в NT подтверждено соответствие последовательностям *P. taeda*. Среди этих 4595 последовательностей 1359 характеризуются покрытием менее 80%, то есть последовательность можно считать рекомбинантной последовательностью между видами сосны и микробиологическими видами. Чтобы подтвердить специфичность захвата генома сосны микробами компоста сосны, искали также соответствия геному *P. trichocarpa* и нашли только 139 соответствий. Аналогичные результаты получены в случае компоста *Populus nigra*. Аннотированные результаты представлены в таблицах 4 и 5.

Представленный анализ секвенирования методом дробовика четко подтверждает обогащение данных метагеномики фрагментов с частичным подобием с геномом сравнения разлагающегося растительного компоста. Иными словами, результаты показывают частичное включение фрагментов ДНК из субстрата компоста, что создает «помеченную растением» микробиому, демонстрирующую ингибирующий эффект.

Таблица 4. Результата анализа метагеномики для компоста *P. halepensis*.

Прочтения генома <i>P. taeda</i> в сравнении с геномом <i>P. taeda</i>	Аннотированные последовательности на основании выборки из 10000 уникальных ID	Последовательности с подтвержденным соответствием с аннотациями <i>P. taeda</i>	Предположительные рекомбинанты: подтверждено <i>P. taeda</i> с покрытием <80%	Последовательности с подтвержденным соответствием с аннотациями <i>P. trichocarpa</i>
108 288	29 149	4595	1359	139

Таблица 5. Результата анализа метагеномики для компоста *P. nigra*

Прочтения генома <i>P. trichocarpa</i> в сравнении с геномом <i>P. trichocarpa</i>	Аннотированные последовательности	Последовательности с подтвержденным соответствием с аннотациями <i>P. trichocarpa</i>	Предположительные рекомбинанты: подтверждено <i>P. trichocarpa</i> с покрытием <80%	Последовательности с подтвержденным соответствием с аннотациями <i>P. Taeda</i>
80 355	80 355	16 281	3206	39

Чтобы подтвердить эти важные результаты, эксперимент повторили и анализ

расширили. Сбор листьев, производство компоста и обработка материалов были как описано выше. Материал компоста инкубировали и разложили в оптимальных условиях в течение 120 дней, образцы собирали через 30 дней и в конце эксперимента. Свежий компост и разложившийся материал через 30 и 120 дней использовали для экстракции ДНК стандартными коммерческими наборами, как описано в работе Mazzoleni et al. (2015), и анализировали экстрагированную ДНК. Мы сравнили прочтения, полученные в ходе применения подхода секвенирования методом дробовика к компосту (0, 30, 120 дней разложения) из растительных видов (*Pinus* и *Populus*) в сравнении с указанными геномами сравнения.

Анализ методами биоинформатики выполнили в соответствии со следующей процедурой: парно-концевые прочтения из экспериментов по метагеномике объединили с использованием функции BBmerged BBmap (Bushnell (2016)), применяя опцию kmers для снижения числа ложно-положительных результатов (extend2=20, iterations=5).

Объединенные прочтения затем выравнивают с геномом хозяина при помощи BLASTn (Camacho et al. (2009)). Все прочтения, характеризующиеся по меньшей мере одним «попаданием» перечислены среди всех совпадающих прочтений, и они перечислены в группе в соответствии со своим покрытием. Возможные рекомбинантные фрагменты соответствуют от 20 до 80 или 90% покрытия. Рассмотрено также фильтрование результатов с 90% идентичностью. Дополнительная информация по процедуре биоинформатики содержится в работе Bushnell (2016) и Camacho et al. (2009).

Результаты представлены в таблице 6. Они показывают, что частота всех распознанных фрагментов ДНК в растениях снижается со временем, подтверждая, что количество свободной растительной ДНК в компосте снижается при продолжении разложения. С другой стороны, количество частичных фрагментов, соответствующих геному растения (то есть, фрагментов, состоящих частично из ДНК растения и частично из ДНК чего-либо еще) возрастает при продолжении разложения (таблица 7), достигая пика через 120 дней. Важно отметить, что материал компоста, разложившийся через 120 дней, демонстрирует наибольший ингибирующий эффект на проращивание семян тех же видов (то есть *Pinus* и *Populus*).

Данные были проанализированы в терминах количества соответствий последовательности (таблица 6) в каждом образце и количества относительных покрытий для каждого считывания части генома (таблица 7). Предполагается, что частично покрытые прочтения отражают химеры в образцах.

Таблица 6. Частота соответствий результатов считываний в программе blast

	PINUS		POPULUS	
	Нет фильтра	Фильтр 90% ID	Нет фильтра	Фильтр 90% ID
0 ДНЕЙ	0,8951	0,6714	0,782	0,834
30 ДНЕЙ	0,1456	0,1090	0,002	0,001
120 ДНЕЙ	0,0016	0,0010	0,001	0,001

В таблице 6 показано, что при рассмотрении частоты соответствий результатов поискового анализа в программе blast для геномов Pinus и Populus, соответственно, для компоста в день 0 наблюдается более высокое число, чем для компоста в день 120. Это означает, что по причине разложения последовательности снижается степень подобия растениям-хозяевам.

Таблица 7. Относительная частота прочтений на покрытие

		PINUS		POPULUS	
		Относительная частота на покрытие без фильтра	Относительная считываний на покрытие при 90% идентичности	Относительная частота на покрытие без фильтра	Относительная частота на покрытие при 90% идентичности
99<=покрытие <=100%	0 ДНЕЙ	0,51	0,57	0,65	0,58
	30 ДНЕЙ	0,49	0,55	0,33	0,42
	120 ДНЕЙ	0,22	0,24	0,28	0,36
20<=покрытие <=90%	0 ДНЕЙ	0,13	0,10	0,14	0,23
	30 ДНЕЙ	0,14	0,12	0,39	0,36
	120 ДНЕЙ	0,44	0,40	0,41	0,36

В таблице 7 показано относительное снижение высокого покрытия прочтений при сравнении с растением-хозяином (уменьшение 99 – 100% значений покрытия) и повышение числа частично покрытых последовательностей (20 – 90% покрытие), что соответствует старению компоста.

Подобие для генома хозяина также исследовали при 90% идентичности с целью устранения возможного ненадежного сходства с растением-хозяином. Уменьшенное покрытие означает наличие химер в прочтениях секвенирования для компоста.

Очень интересная особенность заключается в том, что, с одной стороны,

количество соответствий в растительных геномах демонстрирует очень высокое снижение в быстро разлагающемся компосте листьев тополя, а более медленное разложение компоста сосны соответствует значительно более медленному исчезновению последовательностей ее генома. С другой стороны оба материала демонстрируют постоянное увеличение количества смешанных фрагментов, в которых виды можно еще распознать, отражая естественное разложение в микроорганизмах.

Эти результаты поддерживают образование естественных библиотек, подобно тому, что описано далее в этой заявке для отдельных культур микроводорослей (см. ниже). В данном случае явление образования естественной библиотеки наблюдается в природной микробиоме почвы, которая обогащается ДНК растительного компоста из своего окружения, тем самым оказывая видоспецифичный ингибирующий эффект на растения, образующие компост.

ЭКСПЕРИМЕНТ 7

Природная библиотека *Arthrospira platensis*

С целью дальнейшего подтверждения ингибирования целевых видов собственной ДНК, включенной в природный геном видов-хозяев, индуцировали также естественный захват ДНК, проводя инкубирование *A. platensis*, относящегося к цианобактериям, с ДНК, экстрагируемой из *Arabidopsis thaliana* и затем трансформированной клетками *A. platensis*, используемыми для ингибирования *A. thaliana*.

Перед инкубацией чистую культуру цианобактерий поддерживали в контролируемых условиях (температура 22-24°C, световой период 12/12 часов, облучение 20 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹) в среде роста Заррука без нагнетания воздуха по меньшей мере 4 часа до инкубации.

ДНК *Arabidopsis thaliana* для инкубации приготовили стандартными способами экстракции цельного генома из свежих листьев и подвергли статистическому фрагментированию импульсами ультразвука (подробности см. в протоколе Mazzoleni et al. (2015a)). Образцы подвергали воздействию ультразвука в процессоре VC 505 SONICS Ultrasonic при погружении микронаконечников в микропробирки вместимостью 1,5 мл с холодной водой на водяной бане на 30 минут с циклами включения/выключения 45 с/15 с при 20% амплитуды.

Инкубация *Arthrospira platensis* с ДНК *Arabidopsis thaliana*

Перед инкубацией *A. platensis* культивировали в обедненной Mg⁺⁺ среде роста, чтобы снизить внутриклеточную и внеклеточную активность ДНКазы цианобактерий и облегчить персистенность и включение чужеродной ДНК (Cao et al., 1999). В ходе

инкубации 300 мкл концентрированных клеток *A. platensis* (до 5×10^7 клеток, полученных осторожным центрифугированием) прибавили в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл, содержащую 300 мг стеклянных шариков (диаметр 500 мкм). После этого 100 мкл ранее фрагментированной импульсами ультразвукового излучения ДНК *A. thaliana* и 100 мкл обедненной Mg^{++} среды прибавили в пробирку для инкубации с последующим перемешиванием на вихревой мешалке при максимальной скорости в течение 15 секунд.

Объем образца увеличили до 2,5 мл обедненной Mg^{++} средой Заррука в той же пробирке и инкубировали в осцилляторе при циклах освещения свет/темнота в течение 24 часов. После этого объем непрерывно увеличивали до 10 л, добавляя полную среду Заррука в фото-биореакторе, достигая плотности клеток 1 г сухой массы клеток на литр. Через 90 дней биомассу центрифугировали и собрали получившийся осадок материала с плотностью клеток 100 г сухой массы клеток на литр.

Анализ ингибирования

Осадок цианобактерий подвергли воздействию ультразвука, и полученный гомогенат клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 15 дней, компенсируя испарение воды прибавлением дистиллированной воды. После этого различные аликвоты гомогенатов разбавили в отношении 1:1, 1:10 и 1:100 дистиллированной водой и увлажнили ими фильтровальную бумагу в чашках Петри в трех повторах с 10 растениями для каждого уровня концентрации. Приготовили саженцы *Arabidopsis thaliana* и провели эксперимент, как Эксперимент 1.

Результаты

Наблюдалось изменение цвета культуры *A. platensis* после инкубации с ДНК *A. thaliana*, что дает косвенное указание на включение ДНК *A. thaliana* в клетки *A. platensis*. Фактически, это наблюдавшееся изменение цвета указывает на изменение в экспрессии генов, что с достаточной вероятностью может быть результатом изменения генома *A. platensis* по причине включения ДНК *A. thaliana*.

Результаты анализа ингибирования продемонстрировали ингибирующий эффект смесей гетерологичной и собственной ДНК путем исследования влияния природных библиотек цианобактерий геномов *Arabidopsis thaliana* на конспецифичное выживание саженцев. При высоких концентрациях выживание саженцев было значительно ниже после воздействия природной библиотеки *A. platensis*, которая абсорбировала ДНК *Arabidopsis*, по сравнению с контролем, содержащим раствор микроводорослей без ДНК *Arabidopsis* (то есть, содержащим гетерологичную ДНК, но не ДНК растения) (таблица 8).

Хотя наиболее вероятно, что в геном *A. platensis* встраивается (и, тем самым

реплицируется в клетках *A. platensis*) только фракция ДНК *A. thaliana*, наблюдается значительное ингибирование саженцев *A. thaliana*. Учитывая результаты анализа ингибирования фракцией генома *C. elegans* (см. эксперимент 3), можно ожидать, что при комбинировании ингибирующей трансформированной культуры *A. platensis* с другими культурами, полученными при помощи подобной процедуры трансформации, ингибирующий эффект может возрасти.

Таблица 8. Ингибирование *A. thaliana* трансформированными *Arthrospira platensis*

	1:1	1:10	1:100
Контроль (<i>A. platensis</i>)	0%	0%	0%
ПРИРОДНАЯ библиотека <i>A. platensis</i>	80%	10%	0%

% смертности (10 саженцев/обработка, перенесенных на чашки Петри).

ЭКСПЕРИМЕНТ 8

Подтверждающий эксперимент провели, чтобы дополнительно подтвердить ингибирование при помощи собственной ДНК, включенной в природный геном видов-хозяев. В этом подтверждающем эксперименте два различных вида цианобактерий (фотосинтезирующие микроводоросли) вырастили в биореакторе, в среду роста прибавили фрагментированную ДНК *Arabidopsis* и исследовали ингибирование поврежденной биомассы из цианобактерий.

Выбранными цианобактериями были *Arthrospira platensis* (как в примере 7) и *Synechocystis* sp. PCC6803. Перед инкубированием все культуры поддерживали в условиях культивации, показанных в таблице 1 без нагнетания воздуха по меньшей мере 4 часа до инкубации.

Таблица 9 Инкубируемые виды и соответствующие условия культивации (Штейн)

Инкубируемые виды	Температура (°C)	Световой цикл свет:темнота (ч:ч)	Облучение (мкмоль фотонов м ⁻² сек ⁻¹)	Среда роста
<i>Arthrospira platensis</i>	30	12:12	20	Среда Заррука
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	25	12:12	20	BG11

ДНК, выделенную из собранного клеточного лизата, случайным образом

фрагментировали импульсами ультразвука. Образцы подвергали воздействию ультразвука в процессоре VC 505 SONICS Ultrasonic при погружении микронаконечников в микропробирки вместимостью 1,5 мл с холодной водой на водяной бане на 30 минут с циклами включения/выключения 45 с/15 с при 20% амплитуды.

Инкубация *Arthrospira platensis* с ДНК *Arabidopsis thaliana*

Перед инкубацией *A. platensis* культивировали в обедненной Mg^{++} среде роста, чтобы снизить внутриклеточную и внеклеточную активность ДНКазы цианобактерий и облегчить персистентность и включение чужеродной ДНК (Cao et al., 1999). В ходе инкубации 300 мкл концентрированных клеток *A. platensis* (до 5×10^7 клеток, полученных осторожным центрифугированием) прибавили в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл, содержащую 300 мг стеклянных шариков (диаметр 500 мкм), как описано в работе Dunahay et al. (1997). После этого 100 мкл ранее фрагментированной импульсами ультразвукового излучения ДНК *A. thaliana* (около 10 мкг) и 100 мкл обедненной Mg^{++} среды прибавили в пробирку для инкубации с последующим перемешиванием на вихревой мешалке при максимальной скорости в течение 15 секунд.

Объем образца увеличили до 2,5 мл обедненной Mg^{++} средой Заррука в той же пробирке и инкубировали в осцилляторе при циклах освещения свет/темнота в течение 24 часов. После этого объем непрерывно увеличивали полной средой Заррука.

Инкубация *Synechocystis* sp. PCC6803 с ДНК *Arabidopsis thaliana*

Перед инкубацией клетки культивировали в среде BG11, модифицированной ЭДТА (2 мМ) в течение двух дней, чтобы снизить активность Ca^{++} -зависимой ДНКазы, как описано в работе Zang et al. (2007).

В ходе инкубации 400 мкл концентрированных клеток *Synechocystis* sp. PCC6803 (до 5×10^7 клеток, полученных осторожных центрифугированием и промытых не содержащей ЭДТА средой BG11) прибавили в центрифужные пробирки вместимостью 15 мл, содержащие 100 мкл ДНК *A. thaliana*, ранее фрагментированной ультразвуковыми импульсами (около 10 мкг). Затем пробирку инкубировали в осцилляторе при циклах освещения свет/темнота в течение 5 часов и перенесли содержимое в колбу, где его разбавили до 2,5 мл средой BG11, после чего объем непрерывно увеличивали.

Описание эксперимента

Микроводоросли, которые подвергали воздействию ДНК *Arabidopsis* согласно описанным выше протоколам, использовали для инокуляции в два биореактора по 5 литров каждый и вырастили в стандартных условиях роста до достижения максимальной плотности клеток. После этого из среды извлекли биомассу двух видов с получение гранул, тщательно промыли и затем высушили.

Гранулы водорослей инокулировали 1 г лесной почвы, хранили при комнатной температуре и увлажняли каждую неделю, поддерживая естественное разложение до 60 дней. Пробы распадающегося материала брали каждые 15 дней и наносили на фильтровальную бумагу в оптимальных лабораторных условиях на чашках Петри, чтобы анализировать проращивание и рост корней растений *Arabidopsis* на чашках.

Результаты

Неразложившиеся гранулы не оказывали значимого ингибирующего эффекта на проращивание семян и удлинение корней *Arabidopsis*, в то же время через 30 и 60 дней разложения наблюдалось значимое ингибирование проращивания при обработке разлагающимися гранулами обоих видов. Через 90 дней разложения ингибирующие эффекты разлагающихся гранул продемонстрировали незначительное снижение. Данные результаты показывают, что разложение гранул цианобактерий оказывает четкий ингибирующий эффект на проращивание растений, так как ДНК растений, включенная в геном водорослей, высвобождается в процессе разложения и, в итоге, дополнительно амплифицируется в разлагающих почву микроорганизмов.

Таблица 10 – Результаты анализа ингибирования *Arabidopsis thaliana*, подвергавшихся воздействию (разложившейся) биомассы двух видов *Arthrospira platensis* (СЛЕВА) и *Synechocystis sp. PCC6803* (СПРАВА).

Обработка	Проращивание (% от контроля)	Удлинение корней (% от контроля)
Контроль (вода + удобрения)	100 / 100	100 / 100
Неразложившаяся биомасса	100 / 95	95 / 90
30 дней разложения	80 / 65	75 / 60
60 дней разложения	50 / 30	50 / 20
90 дней разложения	55 / 40	50 / 25

Анализ методами биоинформатики

Геном двух цианобактерий, использованный в качестве природных библиотек в описанных выше экспериментах по проращиванию, секвенировали и проанализировали. Парно-концевые прочтения из экспериментов по метагеномике объединили при помощи функции *BBmerged BBmap* (Bushnell (2016)), применяя опцию *kmers* для снижения числа ложно положительных результатов (*extend2=20, iterations=5*).

Объединенные прочтения затем выравнивали с геномом хозяина с использованием *BLASTn* (Camacho et al. (2009)). Все прочтения, для которых наблюдалось хотя бы одно «попадание» были отнесены к общему числу совпадающих прочтений, и они перечислены

в группе в соответствии со своим покрытием. Возможные рекомбинантные фрагменты соответствуют от 20 до 80 или 90% покрытия. Рассмотрено также фильтрование результатов с 90% идентичностью. Дополнительная информация по методикам биоинформатики содержится в работе Bushnell (2016) и Camacho et al. (2009).

Таблица 11. Результаты анализа биоинформатики

Класс соответствия	Описание класса	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
1	100% покрытие с геномами <i>A. thaliana</i> и цианобактерий	16	82
2	100% покрытие с геномом <i>A. thaliana</i> , частичное покрытие (от 10% до 99%) с геномом цианобактерий	14	5
3	Частичное (от 10% до 99%) покрытие с геномом <i>A. thaliana</i> , 100% покрытие с геномом цианобактерий	498	187542
4	Частичное (от 10% до 99%) покрытие с геномами <i>A. thaliana</i> и цианобактерий	3524	5881
5	100% покрытие с геномом <i>A. thaliana</i> , отсутствие соответствия с геномом цианобактерий	0	0
Все	Покрывтие > 10% с геномом <i>A. thaliana</i>, любое покрытие с геномом цианобактерий	4052	193510

В таблице 11 показано, что количество последовательностей, обнаруженных в составе ДНК образцов цианобактерий и соответствующих геному *A. thaliana*, в основном, меняется не только между видами, но также и среди различных классов соответствия, определенных в соответствии с процентом покрытия геномов растений и цианобактерий.

Для классов 1 и 2 обнаружен очень низкий результат, возможно, это связано с неопределенностью методов секвенирования и биоинформатики. Класс 3 показал наибольшее различие между образцами, возможно, связанное с различиями размеров генома, числа копий хромосом и доступности данных для проводимого в программе Blast исследования геномных баз данных сравнения между двумя цианобактериями. Данные класса 4 показывают наличие возможных химерных последовательностей, частично соответствующих геномам и растений, и цианобактерий в образцах обоих типов. Класс 5 содержит нулевые значения, демонстрируя, что образцы обоих типов не включают свободную ДНК *A. thaliana*, не входящую в состав химерных последовательностей.

Следует отметить, что образец *Synechocystis* sp. PCC 6803, продемонстрировавший больший ингибирующий эффект на саженцы *A. thaliana* в сравнении с образцом *Arthrospira platensis*, также продемонстрировал большее количество последовательностей ДНК, соответствующих геному *A. thaliana*, как при изучении числа последовательностей для всех классов вместе, так и отдельно для каждого значимого класса. Это подтверждает утверждение, что ингибирующие эффекты связаны с фрагментами собственной ДНК, и что эти ингибирующие эффекты фрагментов собственной ДНК сохраняются в случае ассоциации с ДНК видов-хозяев. На основании данного эксперимента дополнительно подтверждается, что виды-хозяева могут эффективно реплицировать ингибирующую собственную ДНК филогенетически отдаленных целевых видов в своих природных геномах.

ЭКСПЕРИМЕНТ 9

Провели дополнительный подтверждающий эксперимент для анализа ингибирования сорной травы *Portulaca oleracea* фрагментированной собственной ДНК, подвергавшейся разложению и абсорбции почвенной микробиомой. Анализ проводили на опытной делянке со шпинатом на ферме, где постоянной проблемой было заражение *Portulaca*.

Сначала библиотеку ВАС *Portulaca oleracea* генерировали в компании Bio S&T (Монреаль, Канада) способами, подобными тем, что использовали для библиотеки *Cyperus aesculentus*, рассматривавшейся в эксперименте 2. Хранившуюся одну ночь культуру библиотеки (усиливающий бульон (Terrific Broth (TB)) в качестве культуральной среды, перемешивание при 250 об/мин, T= 37°C) использовали в качестве начальной культуры для ферментации в биореакторе (1% полезного объема биореактора) вместимостью 60 л с полезным объемом 40 литров.

В качестве субстрата для крупномасштабной жидкой ферментации использовали питательный бульон (Nutrient Broth (NB)). Дополнительно, к общему объему культуральной среды прибавили 0,1% L-арабинозы для индуцирования плазмиды pSmart-HindIII. Жидкую ферментацию проводили 2 дня в условиях контролируемой температуры, перемешивания, аэрации и pH для получения ферментационного бульона с высокой плотностью клеток, который стимулирован продуцирование ДНК плазмиды. Достигнутая концентрация была около $5,6 \times 10^8$ клеток/мл, по данным ОП₆₀₀.

Инокуляция и созревание компоста

Ферментационный бульон, полученный как описано выше, кипятили около 15 минут и затем нанесли на торф в трех различных концентрациях:

1. 30 мл/кг (1)
2. 3 мл/кг (разведение 1:10)
3. 0,3 мл/кг (разведение 1:100)

Инокулированную почву оставили созреть на воздухе приблизительно на 20 дней. Таким способом полученный продукт использовали в полевых испытаниях.

Полевые испытания

Полевые испытания проводили на ферме в Салерно (Италия), где постоянной проблемой было заражение *Portulaca*.

За два дня до высевания шпината (в середине июля) продукт распределяли по следующей схеме:

Полевой эксперимент (блок размером около 2 x 2,4 м).

CNT	1	CNT	1:10	CNT	1:100
1:100	CNT	1:10	CNT	1	CNT

(CNT = Контроль (торф без добавления кипяченного ферментационного бульона))

В теплицах туннельного типа, расположенных рядом с той, что подготовили для экспериментов, борьбу с сорной травой *Portulaca* проводили в соответствии с обычными сельскохозяйственными практиками, допускалось применение гербицидов в соответствии с действующим законодательством, включая дополнительный контроль для оценки эффективности изучаемого продукта.

В частности, обычная принятая фермерами практика борьбы предполагает использование метам-натрия, который представляет собой сельскохозяйственный пестицид общего применения, в основном используемый как фумигант почвы до посева с целью контроля сорняков, семян сорняков, грибов, нематод и почвенных насекомых. Обработка метам-натрием является дорогостоящей и разрушающей почву процедурой, вызывающей утрату биоразнообразия ризосферы.

После прорастания шпината (около 10 дней после посева) выполнили первый анализ, с этого момента остальные оценки проводили еженедельно до окончания жизненного цикла культивируемого шпината. Чтобы убедиться в ингибирующем эффекте продукта на скорость прорастания *Portulaca*, в ходе полевой оценки растения *Portulaca* выпалывали, пересчитывали и проверяли корни на наличие некроза.

Результаты

Как показано на Фиг. 5, наблюдали значительное снижение количества растений *Portulaca* в блоке обработки 1, как определено в конце анализа. Кроме того, как и ожидалось, в блоке с меньшим числом растений *Portulaca* количество проросшего шпината было значительно выше.

Этот эксперимент дополнительно подтверждает, что ингибирующие эффекты связаны с фрагментами собственной ДНК, а также то, что эти ингибирующие эффекты фрагментов собственной ДНК сохраняются, когда фрагменты собственной ДНК амплифицируются в видах-хозяевах и ассоциированы с ДНК видов-хозяев. Учитывая используемый экспериментальный протокол и рассмотрев результаты описанных выше экспериментов, разумно ожидать, что амплификация фрагментов ДНК *Portulaca* микробиомой торфа должна вносить вклад в ингибирующий эффект.

ЭКСПЕРИМЕНТ 10

Ингибирование фрагментами ДНК филогенетически подобных видов

Ингибирование фрагментами ДНК филогенетически подобных видов (не ассоциированных с последовательностями ДНК видов-хозяев) изучали с использованием фрагментированной ДНК в соответствии с WO2014/020624. Учитывая результаты других экспериментов, можно ожидать, что если ингибирующие эффекты наблюдаются для фрагментов ДНК согласно WO2014/020624, эффекты будут также наблюдаться для ДНК в композиции по настоящему изобретению при ее фрагментации.

Экстракция и количественная оценка ДНК из растительного материала

ДНК экстрагировали из материала листьев растений с помощью набора DNeasy Plant Maxi Kit, как описано в инструкции производителя (QIAGEN, Валенсия, штат Калифорния) для приготовления раствора для обработки с использованием протокола из статьи Fulton *et al.*, (1995) (Приложение Е). Собрали 100 г (сырая масса) исходного материала и заморозили его при -20°C. Затем образцы измельчили, погрузив в 200 мл свежего микропрепаративного буфера, после чего профильтровали через ситовую ткань. ДНК ресуспендировали в чистой стерильной воде. Экстрагированную из листьев ДНК фрагментировали воздействием ультразвука до целевого размера 200-500 п.о. Эту процедуру провели на приборе Bandelin Sonopulse (Bandelin, Берлин, Германия) при 90% мощности с импульсами по 0,9 секунд в течение 12 минут. Верификацию размера сонированных полос выполнили визуально на 3% агарозном геле MetaPhor™ (Lonza scientific, Нью-Джерси, США) на приборе Sybr® Safe (Invitrogen).

Биоанализ влияния очищенной ДНК на целевые растения

Аутоотоксические и фитотоксические эффекты очищенной ДНК, экстрагированной из листьев растений, проанализировали на восьми целевых видах (таблица 12). Дизайн эксперимента был следующий: 1. Контроль со стерильной дистиллированной водой; 2. Добавление всей экстрагированной и случайным образом фрагментированной собственной ДНК; 3. Добавление всей экстрагированной и случайным образом фрагментированной ДНК из отдельных гетероспецифичных видов (таблица 1); ДНК наносили в концентрации $200 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Биоанализ провели *in vitro* с использованием семян со стерильной поверхностью ($n=20$ на каждую плашку) для каждого целевого вида (4 повтор), помещенных в чашки Петри размером 9 см на стерильную фильтровальную бумагу, пропитанную 4 мл испытуемых растворов. Длину корней саженцев измеряли через различное число дней с начала эксперимента на целевых видах (таблица 12). Чашки Петри поместили в камеру роста (температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$, увлажнение каждые два дня дистиллированной водой) в соответствии с полностью рандомизированным дизайном.

Таблица 12. Схема биоанализа с указанием метрики, целевых растений, продолжительности эксперимента, видов растений, используемых для экстракции ДНК, а также филогенетического расстояния между целевым и исходным растением, определенном как описано в способах.

Метрика	Целевые виды растений (семейство, отряд)	Продол. эксп-та	Исходные виды для экстракции ДНК (семейство, отряд)	Филогенетическое расстояние
Рост корней	<i>Acanthus mollis</i> (<i>Acanthaceae</i> , <i>Lamiales</i>)	14 дней	<i>Acanthus mollis</i> (<i>Acanthaceae</i> , <i>Lamiales</i>)	0
			<i>Coronilla emerus</i> (<i>Fabaceae</i> , <i>Fabales</i>)	17
			<i>Festuca drymeia</i> (<i>Poaceae</i> , <i>Poales</i>)	23
			<i>Fraxinus ornus</i> (<i>Oleaceae</i> , <i>Lamiales</i>)	2
			<i>Hedera helix</i> (<i>Araliaceae</i> , <i>Apiales</i>)	8
			<i>Populus nigra</i> (<i>Salicaceae</i> , <i>Malpighiales</i>)	18
			<i>Quercus ilex</i> (<i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i>)	19
	<i>Ampelodesmos mauritanicus</i> (<i>Poaceae</i> , <i>Poales</i>)	14 дней	<i>Ampelodesmos mauritanicus</i> (<i>Poaceae</i> , <i>Poales</i>)	0
			<i>Coronilla emerus</i> (<i>Fabaceae</i> , <i>Fabales</i>)	21
			<i>Festuca drymeia</i> (<i>Poaceae</i> , <i>Poales</i>)	1
			<i>Fraxinus ornus</i> (<i>Oleaceae</i> , <i>Lamiales</i>)	24
			<i>Hedera helix</i> (<i>Araliaceae</i> , <i>Apiales</i>)	26
			<i>Populus nigra</i> (<i>Salicaceae</i> , <i>Malpighiales</i>)	22
			<i>Quercus ilex</i> (<i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i>)	23
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Brassicaceae</i> , <i>Brassicales</i>)	7 дней	<i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Brassicaceae</i> , <i>Brassicales</i>)	0
			<i>Fraxinus ornus</i> (<i>Oleaceae</i> , <i>Lamiales</i>)	20
			<i>Hedera helix</i> (<i>Araliaceae</i> , <i>Apiales</i>)	21
			<i>Lepidium sativum</i> (<i>Brassicaceae</i> , <i>Brassicales</i>)	1
	<i>Festuca drymeia</i> (<i>Poaceae</i> , <i>Poales</i>)	14 дней	<i>Coronilla emerus</i> (<i>Fabaceae</i> , <i>Fabales</i>)	21
			<i>Festuca drymeia</i> (<i>Poaceae</i> , <i>Poales</i>)	0
			<i>Fraxinus ornus</i> (<i>Oleaceae</i> , <i>Lamiales</i>)	24
			<i>Hedera helix</i> (<i>Araliaceae</i> , <i>Apiales</i>)	26
			<i>Populus nigra</i> (<i>Salicaceae</i> , <i>Malpighiales</i>)	22
			<i>Quercus ilex</i> (<i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i>)	23

<i>Lepidium sativum</i> (<i>Brassicaceae</i> , <i>Brassicales</i>)	3 дня	<i>Coronilla emerus</i> (<i>Fabaceae</i> , <i>Fabales</i>)	11
		<i>Festuca drymeia</i> (<i>Poaceae</i> , <i>Poales</i>)	24
		<i>Fraxinus ornus</i> (<i>Oleaceae</i> , <i>Lamiales</i>)	20
		<i>Hedera helix</i> (<i>Araliaceae</i> , <i>Apiales</i>)	21
		<i>Lepidium sativum</i> (<i>Brassicaceae</i> , <i>Brassicales</i>)	0
		<i>Populus nigra</i> (<i>Salicaceae</i> , <i>Malpighiales</i>)	12
		<i>Quercus ilex</i> (<i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i>)	13
<i>Quercus ilex</i> (<i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i>)	28 дней	<i>Alnus glutinosa</i> (<i>Betulaceae</i> , <i>Fagales</i>)	2
		<i>Coronilla emerus</i> (<i>Fabaceae</i> , <i>Fabales</i>)	4
		<i>Fagus sylvatica</i> (<i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i>)	1
		<i>Festuca drymeia</i> (<i>Poaceae</i> , <i>Poales</i>)	23
		<i>Fraxinus ornus</i> (<i>Oleaceae</i> , <i>Lamiales</i>)	19
		<i>Hedera helix</i> (<i>Araliaceae</i> , <i>Apiales</i>)	20
		<i>Populus nigra</i> (<i>Salicaceae</i> , <i>Malpighiales</i>)	7
		<i>Quercus ilex</i> (<i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i>)	0
<i>Robinia pseudoacacia</i> (<i>Fabaceae</i> , <i>Fabales</i>)	28 дней	<i>Coronilla emerus</i> (<i>Fabaceae</i> , <i>Fabales</i>)	1
		<i>Festuca drymeia</i> (<i>Poaceae</i> , <i>Poales</i>)	21
		<i>Fraxinus ornus</i> (<i>Oleaceae</i> , <i>Lamiales</i>)	17
		<i>Hedera helix</i> (<i>Araliaceae</i> , <i>Apiales</i>)	18
		<i>Populus nigra</i> (<i>Salicaceae</i> , <i>Malpighiales</i>)	5
		<i>Quercus ilex</i> (<i>Fagaceae</i> , <i>Fagales</i>)	4
		<i>Robinia pseudoacacia</i> (<i>Fabaceae</i> , <i>Fabales</i>)	0

Для каждого биоанализа филогенетическое расстояние, разделяющее целевые виды и виды растений, использовавшихся в качестве источника для экстракции ДНК, определили следующим способом:

- конспецифичные – нулевое расстояние
- виды, принадлежащие одному семейству – расстояние = 1
- виды, принадлежащие различным семействам в пределах одного отряда – расстояние = 2
- виды, принадлежащие различным отрядам – расстояние $2 + N$, где N равняется количеству узлов дерева, разделяющего отряды растений на справочном филогенетическом дереве (APG 2009, Фиг. 6), где показан филогенез таксономических отрядов Angiosperms (то есть, покрытосеменных растений).

Виды, семейства и отряды всех растений, используемых в биоанализе, а также итоговые филогенетические расстояния для всех пар целевых растений и растений-источников ДНК представлены в таблице 12.

Результаты биоанализа (то есть, рост корней целевых видов) были выражены в процентах от контроля, обработанного дистиллированной водой, и нанесены на график как функция филогенетического расстояния, разделяющего ДНК исходного и целевого видов.

Результаты

Результаты биоанализа показывают четкое ингибирующее влияние на рост корней целевых видов со стороны их собственной ДНК (Фиг. 7). В случае ДНК видов, филогенетически подобных (в рамках одного таксономического отряда) целевым видам, также наблюдались значительные ингибирующие влияния, хотя и меньше, чем влияние ДНК самих целевых видов. Влияние гетерологичной ДНК видов, отдаленных от целевых видов, было незначительным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bergomaz, R., Boppré, M., 1986. A simple insect diet for rearing Arctiidae and other moths (*Journal of the Lepidopterists' Society*, 40, 131–137.

Bonanomi G, Incerti G, Barile E, Capodilupo M, Antignani V, Mingo A, Lanzotti V, Scala F, Mazzoleni S. 2011. Phytotoxicity, not nitrogen immobilization, explains plant litter inhibitory effects: evidence from solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. *New Phytologist*, 191: 1018–1030.

Bushnell B, 2016. BBMap short read aligner. University of California, Berkeley, California. URL <http://sourceforge.net/projects/bbmap>.

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 421.

Cao, J., Xu, Z., Qiu, G. and Li, B., 1999. Effects of Mg^{2+} on the growth and DNase activity of *Spirulina platensis*, a cyanobacterium. *Bioresource technology*, 67(3), pp.287-290.

Dunahay, Terri G., Sally A. Adler, and Jonathan W. Jarvik. "Transformation of microalgae using silicon carbide whiskers." *Recombinant Gene Expression Protocols*. Humana Press, 1997. 503-509.

Mazzoleni, S., Bonanomi, G., Incerti, G., Chiusano, M.L., Termolino, P., Mingo, A., Senatore, M., Giannino, F., Carteni, F., Rietkerk, M. and Lanzotti, V., 2015a. Inhibitory and toxic effects of extracellular self-DNA in litter: a mechanism for negative plant–soil feedbacks?) *New Phytologist*, 205(3), pp. 1195-1210.

Mazzoleni, S., Carteni, F., Bonanomi, G., Senatore, M., Termolino, P., Giannino, F., Incerti, G., Rietkerk, M., Lanzotti, V. and Chiusano, M.L., 2015b. Inhibitory effects of extracellular self-DNA: a general biological process? *New Phytologist*, 206(1), pp.127-132.

Smit AF, Hubley R, Green P. 1996. RepeatMasker. URL: <http://www.repeatmasker.org>.

Sang JH (1978) The nutritional requirements of *Drosophila*. The Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 2 (ed. By M. Ashburner & TRF Wright), pp. 159–192. Academic Press, New York, NY, USA.

Stein, J. (ED.) Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. 448 pp.

Zang, X., Liu, B., Liu, S., Arunakumara, K. K. I. U., & Zhang, X. (2007). Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of Microbiology*, 45(3), 241-245.

Angiosperm Phylogeny Group (AGP), 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161(2): 105–121, DOI:10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x.

Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 13: 207-209.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая смесь молекул ДНК, имеющая последовательности ДНК из различных источников, причем указанная смесь содержит несколько первичных последовательностей ДНК, предпочтительно, из последовательностей ДНК хромосом, видов, исходных видов, и несколько вторичных последовательностей ДНК, предпочтительно, последовательностей ДНК хромосом, из видов, видов-хозяев, отличающихся от исходных видов, причем смесь молекул ДНК может содержать молекулы химерной ДНК, где последовательности ДНК исходных видов фланкированы по меньшей мере с одного конца последовательностями ДНК неисходных видов, причем указанные последовательностями ДНК неисходных видов выбраны из последовательностей ДНК видов-хозяев, предпочтительно, последовательностями ДНК хромосом природного генома видов-хозяев, или из последовательностей ДНК искусственной конструкции ДНК, такой как выбрана из плазмиды, космиды или искусственной хромосомы.

2. Композиция по п.1, содержащая популяцию клеток видов-хозяев, предпочтительно видов-хозяев, выбранных из микробиологических видов, где молекулы ДНК присутствуют в клетках видов-хозяев, предпочтительно, в жизнеспособных клетках видов-хозяев.

3. Композиция по любому из пп. 1-2, где молекулы ДНК содержат нефрагментированные молекулы химерной ДНК и последовательности ДНК исходных видов содержат частичные последовательности ДНК, предпочтительно случайным образом генерированные частичные последовательности ДНК хромосом, или содержат последовательности кДНК, обратно транскрибированные из транскриптом видов-хозяев, включенных в молекулы химерной ДНК.

4. Композиция по п.1, где молекулы ДНК представляют собой фрагментированные молекулы ДНК.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, где последовательности ДНК исходных видов содержат последовательности ДНК хромосом и покрытие генома исходного вида в смеси молекул ДНК находится в диапазоне 20-100%, таком как 20-90%, 30-100%, 30-90%, 40-100%, 40-90%, 50-100%, 50-90%, предпочтительно 60-100%, таком как 60-90%, 70-100%, 70-90%, 80-100%, 80-90%.

6. Композиция по любому из пп. 1-5, где ДНК неисходных видов, предпочтительно ДНК видов-хозяев, находится в избытке относительно ДНК исходных видов, предпочтительно, таком, что отношение ДНК неисходных видов к ДНК исходных видов

находится в диапазоне от 10:1 и 1000: 1, таком как от 20:1 до 500:1, от 50:1 до 500:1, от 100:1 до 500:1.

7. Композиция по любому из пп. 1-6, где виды-хозяева выбраны из микробиологических видов, таких как бактериальные виды, или виды аскомицетов, или виды архей, или микрофиты, а также многоклеточных организмов, таких как многоклеточные растения или гельминты, почвенных микроорганизмов, микроорганизмов со статусом GRAS, микробных агентов биоконтроля.

8. Композиция по п.7, где бактериальные виды выбраны из следующих: *E. coli*, виды *Bacillus*, виды *pseudomonas*, виды молочнокислых бактерий, такие как *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp., или *Streptococcus* spp, виды цианобактерий, такие как an *Arthrospira* species, в частности *Arthrospira plantensis* или *Arthrospira maxima*, микробиологические виды аскомицетов, выбранных из *Saccharomyces* species, таких как *saccharomyces cerevisiae*, или виды *Aspergillus* species, такие как *Aspergillus niger*, *Aspergillus илиузае*, или *Aspergillus nidulans*, или из, молочнокислых бактерий, таких как *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., или *Streptococcus* spp или из цианобактерий, таких как *Arthrospira* species, в частности *Arthrospira plantensis* или *Arthrospira maxima*, многоклеточные растения, выбранные из сельскохозяйственных культур, предпочтительно, пищевых сельскохозяйственных культур, таких как выбранные из злаков, кукурузы, сахарной свеклы, рапса, гороха, сои, масличных культур, таких как рапс, эфиопская горчица, подсолнечник, крахмальных культур, таких как (сладкое) сорго, волокнистых культур, таких как лен или конопля, лигноцеллюлозных культур , таких как тростник, канареечник, тростник гигантский, просо, мискантус, кардон, лесных культур с коротким севооборотом, таких как ива, тополь или эвкалипт, виды гельминтов, выбранных из гельминтов, используемых в терапии гельминтами, таких как *Trichuris suis*, *Necatum americanus*, *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis diminuta*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides sterculialis*, *Enterobius vermicularis* или *Hymenolepis nana*, почвенные микроорганизмы, выбранные из *Alphaproteobacteria* spp., *Betaproteobacteria* spp., *Deltaproteobacteria* spp., *Actinobacteria* spp., *Thermoleophilia* spp., *Rubrobacteria* spp., *Chiliacidobacteria* spp., *Acidobacteria* spp., или *Solibacteres* spp., микробные агенты биоконтроля, выбранные из бактериальных агентов биоконтроля, в частности *Bacillus thuringiensis* или *Bacillus subtilis*, или грибковых агентов биоконтроля, например, энтомопатогенные грибы, такие как *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosuvulosea*, *Lecanicillium* spp., или *Metarhizium* spp. или, например, *Trichoderma* spp. или *Ampelomyces quisqualis*.

9. Композиция по любому из пп. 1-8, где исходные виды выбраны из целевых

видов или из видов, филогенетически подобных целевым видам, где целевые виды представляют собой виды, ассоциированные с заболеваниями, такие как патогенные виды, паразитические виды или виды, служащие переносчиками инфекций, или инвазивные виды, или виды ассоциированные с разрушением продуктов, таких как пищевые продукты и (или) косметические продукты и (или) фармацевтические продукты и (или) другие продукты, содержащие органические вещества.

10. Композиция по п.9, где целевые виды выбраны из патогенных видов, предпочтительно топических патогенных целевых видов, наиболее предпочтительно патогенных целевых видов, выбранных из архей, бактерий, грибов (включая дрожжи), и протист, паразитических видов, в частности, видов, паразитирующих на людях и (или) сельскохозяйственных животных и (или) домашних питомцев, предпочтительно, паразитических видов, выбранных из кожных паразитов и (или) желудочно-кишечных паразитов и (или) паразитов слизистой оболочки, фитопатогенных видов, таких как растительные патогены, выбранные из грибов, оомицетов, бактерий, вирусов или протист, членистоногих сельскохозяйственных вредителей, переносчиков заболеваний животных, предпочтительно переносчиков заболеваний, выбранных из членистоногих, переносчиков заболеваний растений, предпочтительно переносчиков заболеваний, выбранных из членистоногих, видов нематод, паразитирующих на растениях, видов сорняков или видов, вызывающих разрушение продуктов.

11. Композиция по любому из пп. 1-10, где виды-хозяева выбраны из источников питания целевых видов, например, где виды-хозяева выбраны из бактериальных видов, а целевые виды выбраны из питающихся бактериями видов нематод, или где виды-хозяева представляют собой многоклеточные растения, а целевые виды представляют собой растительоядные виды, такие как растительноядные членистоногие виды или виды живущих в земле брюхоногих моллюсков.

12. Композиция по любому из пп. 1-11, где размер последовательностей ДНК исходных видов находится в диапазоне от около 50 п.о. до около 2 Мегабаз, таком как, от 50 до 3000 п.о., от 100 до 1500 п.о., от 100 до 2000 п.о., от 100 до 2500 п.о., или, альтернативно, от 0,3 до 15 т.п.о., таком как от 1 до 10 т.п.о., таком как от 5 до 10 т.п.о., или альтернативно от 15 до 60 т.п.о., таком как от 15 до 40 т.п.о., от 25 до 40 т.п.о., или, альтернативно, от 40 до 340 т.п.о., таком как от 50 до 200 т.п.о., таком как от 120 до 300 т.п.о., таком как от 200 до 300 т.п.о., или, альтернативно, от 250 т.п.о. до 2 Мегабаз, таком как от 400 т.п.о. до 1500 т.п.о. или от 400 т.п.о. до 1000 т.п.о., или, альтернативно, от 0,3 до 2 Мегабаз, таком как от 1 т.п.о. до 2 Мегабаз, таком как от 10 т.п.о. до 2 Мегабаз, таком как от 100 т.п.о. до 2 Мегабаз, таком как от 360 т.п.о. до 1 Мегабаз

13. Композиция по любому из пп. 1-12, где при наличии ДНК искусственной конструкции ДНК, композиция содержит ДНК искусственной конструкции ДНК, выбранной из плазмиды, космиды, фосмиды или искусственной хромосомы, такой как бактериальная искусственная хромосома, искусственная хромосома дрожжей или искусственная хромосома грибов.

14. Композиция по любому из пп. 1-13, где исходные виды и виды-хозяева филогенетически удалены друг от друга, предпочтительно они выбраны из различных таксономических отрядов, такие как выбранные из различных классов, различных филумов, различных царств или различных доменов

15. Композиция по любому из пп. 1-14, где, исходные виды выбраны из целевых видов или из видов, филогенетически подобных целевым видам, а целевые виды выбраны из Lepidoptera, в частности, выбраны из семейства Tortricidae, таком как из рода Choristoneura, в частности из Choristoneura orae, Choristoneura fumiferana или Choristoneura freeman, или выбраны из семейства Noctuidae, таком как из рода Spodoptera, в частности из Spodoptera frugiperda, Spodoptera litura, Spodoptera littoralis, Spodoptera ciliatum или Spodoptera ornithogalli, или выбраны из семейства Pyralidae, таком как из рода Plodia или Ephestia, или из Diptera, Coleoptera или Hymenoptera, и наиболее предпочтительно, выбраны из рода Choristoneura, и композиция дополнительно содержит биоконтролирующий агент, направленный против целевых видов, такой как бактериальный биоконтролирующий агент, такой как, *Bacillus thuringiensis* или *Bacillus subtilis*, или грибковый биоконтролирующий агент, например энтомопатогенный гриб, такой как *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium* spp. или *Metarhizium* spp., причем биоконтролирующий агент предпочтительно представляет собой биомассу *Bacillus thuringiensis*, где наиболее предпочтительно биомасса *Bacillus thuringiensis* представляет собой жизнеспособные клетки видов-хозяев.

16. Композиция по любому из пп. 1-15 в фармацевтически приемлемой форме.

17. Композиция по любому из пп. 1-15, представляющую собой композицию для сельского хозяйства.

18. Композиция по любому из пп. 1-16 для применения в качестве медикамента, в частности, медикамента, предназначенного для лечения инфекций целевыми видами, выбранными из паразитов и (или) патогенов, предпочтительно, инфекций патогенами и (или) паразитами кожи, ногтей или слизистых оболочек, в частности, слизистой оболочки глаз, рта, желудочно-кишечного тракта, влагалища, мочевыводящих путей, дыхательных путей, включая легкие, где исходные виды выбраны из целевых видов или видов, филогенетических подобных целевым видам, где предпочтительно виды филогенетически

подобны, если они относятся к одному таксономическому отряду, такому как одно семейство или один род.

19. Применение, такое как немедицинское применение или медицинское применение, композиции по любому из пп. 1-16 в качестве продукта для ингибирования видов, целевых видов, где исходные виды выбраны из целевых видов или из видов, филогенетически подобных целевым видам, где предпочтительно виды филогенетически подобны, если они относятся к одному таксономическому отряду, такому как одно семейство или один род.

20. Применение по п.19, где композиция содержит клетки видов-хозяев, и молекулы ДНК содержатся в клетках видов-хозяев, и при указанном применении клетки видов-хозяев разрушаются, а материал из разрушенных клеток видов-хозяев используется для ингибирования целевых видов, необязательно после выделения ДНК из разрушенных клеток.

21. Способ ингибирования видов, целевых видов, предусматривающий воздействие на указанные целевые виды композиции по любому из пп. 1-17, где исходные виды выбраны из целевых видов или из видов, филогенетически подобных целевым видам, где предпочтительно виды филогенетически подобны, если они относятся к одному таксономическому отряду, такому как одно семейство или один род.

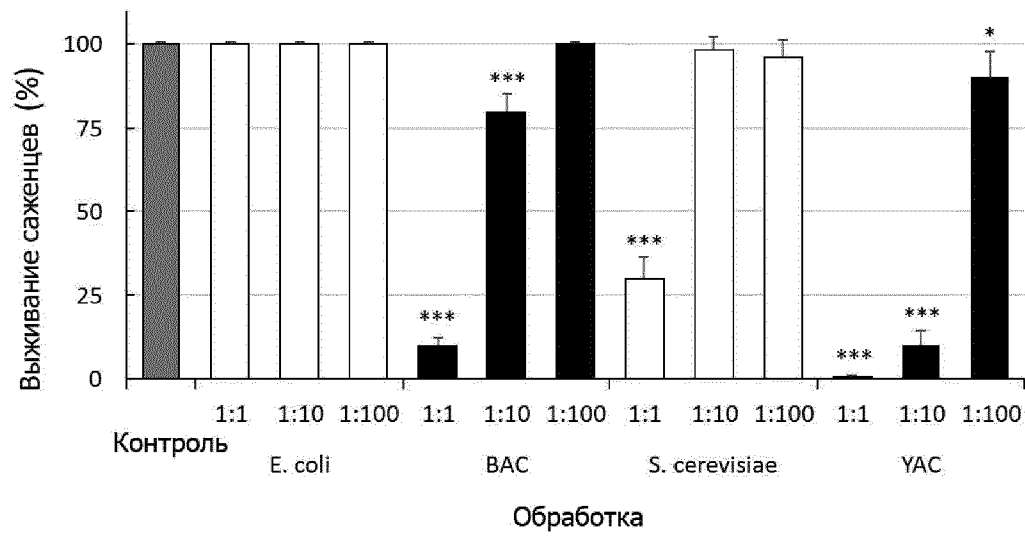
22. Способ по п.21, где способ представляет собой нетерапевтический способ или терапевтический способ.

23. Способ производства композиции по пп. 1-17, включающий:

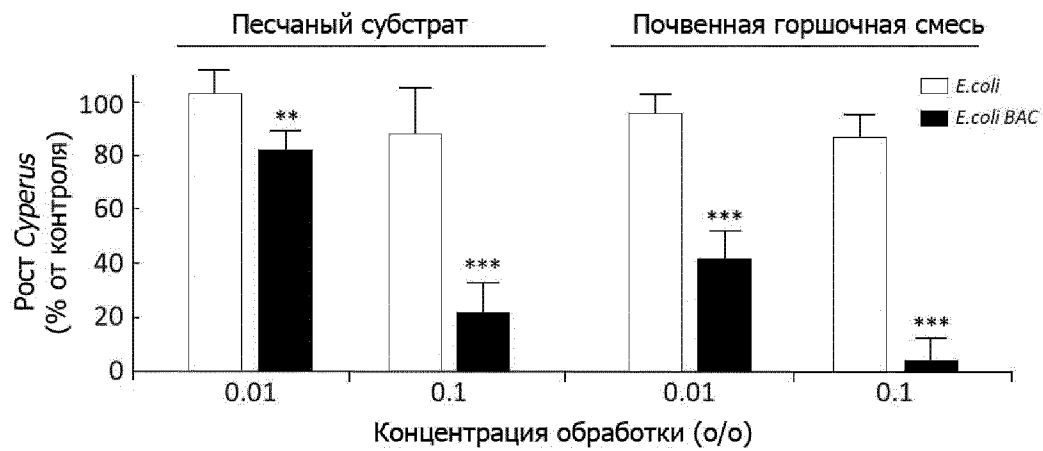
- получение источника ДНК из исходных видов, необязательно, содержащих фрагментированные ДНК исходных видов;
- - получение клеток нескольких видов, видов-хозяев, отличающихся от исходных видов;
- воздействие на клетки видов-хозяев с источником ДНК исходных видов условий, позволяющих клеткам видов-хозяев захватить ДНК исходного вида в реплицируемой форме;
- необязательно, выделение клеток вида-хозяина;
- необязательно, выделение ДНК из клеток видов-хозяев;
- необязательно, фрагментация ДНК клеток видов-хозяев.

24. Способ производства сельскохозяйственного продукта из нескольких видов (не человека), производственных видов, подверженных инфицированию и (или) попаданию паразитов или заражению патогенными видами или видами-вредителями, указанный способ включает:

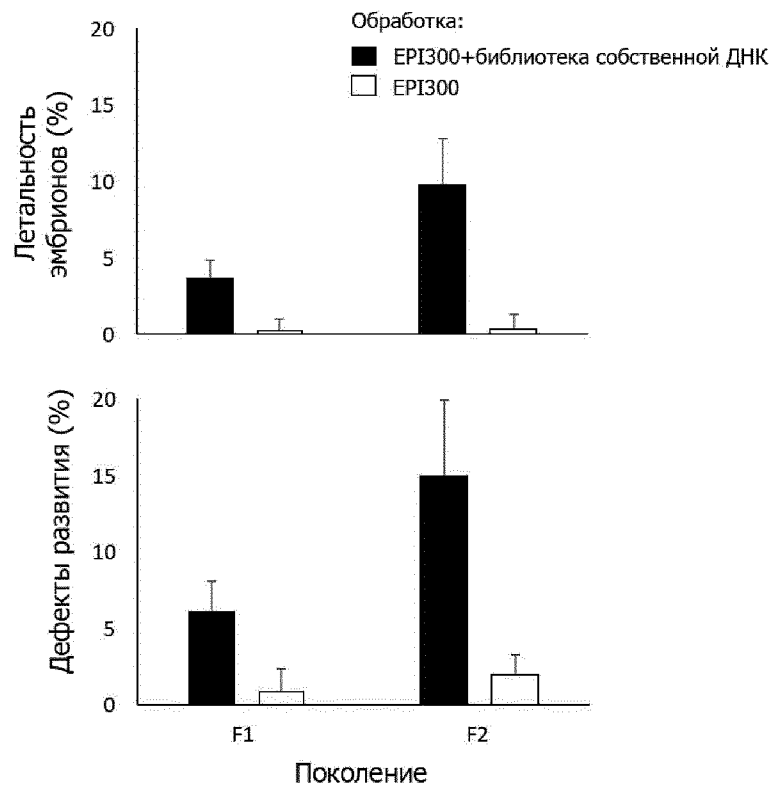
- получение нескольких индивидуумов нескольких производственных видов на площади, целевой площади;
- предоставление индивидуумам производственных видов или на целевой площади композиции по любому из пп. 1-15 или 17;
- предоставление индивидуумам нескольких производственных видов подходящих питательных веществ и создание для них подходящих условий окружающей среды, чтобы получить сельскохозяйственный продукт.



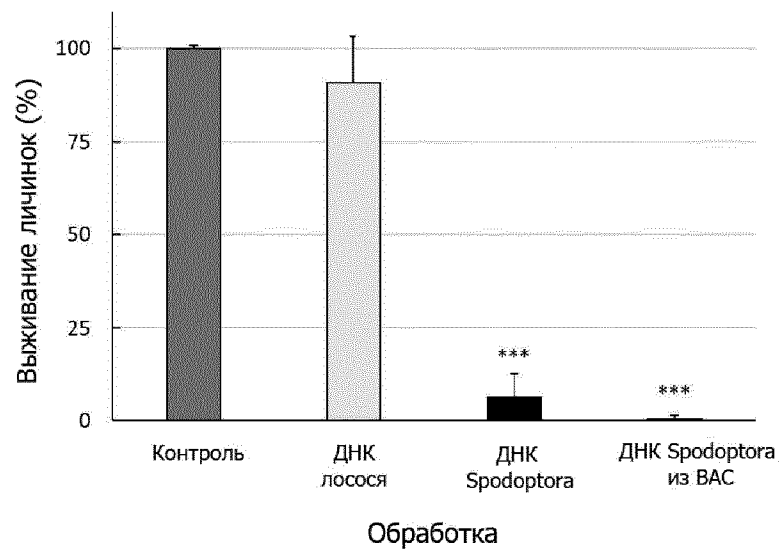
Фиг. 1



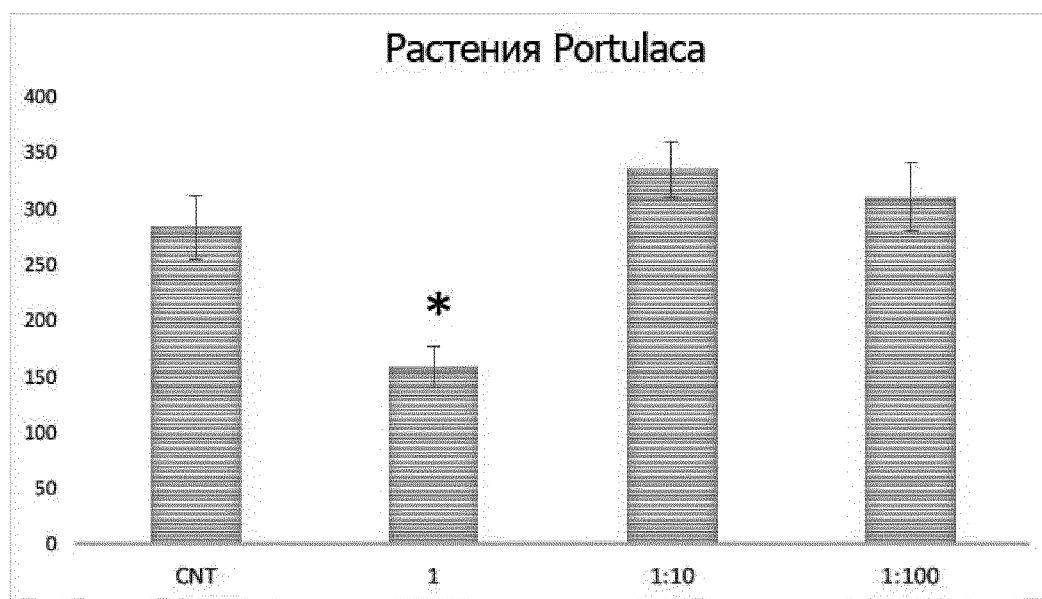
Фиг. 2



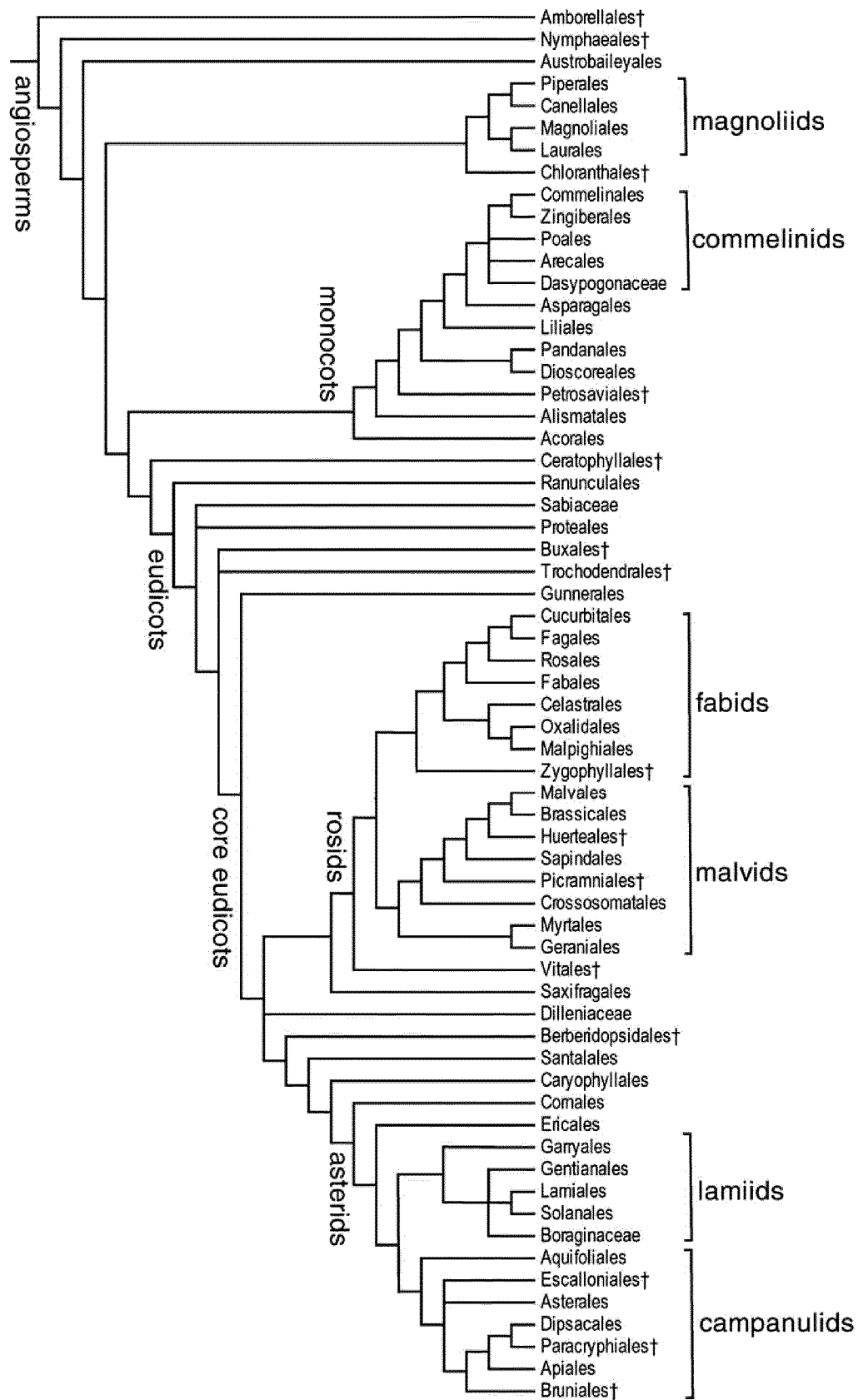
Фиг. 3



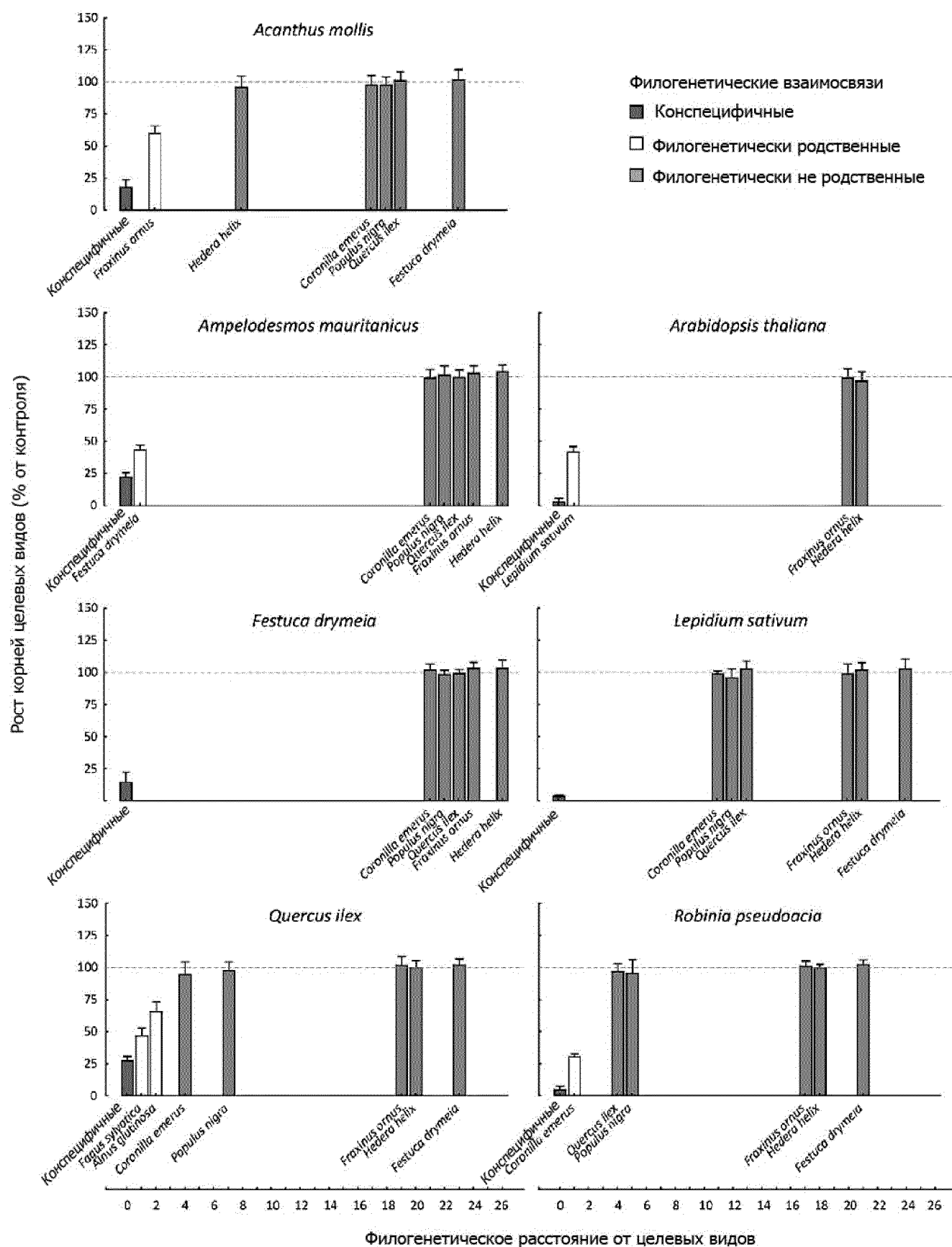
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7