

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 698**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A01N 43/00 (2006.01)

A01N 25/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2014** **PCT/US2014/063832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015** **WO15066681**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2014** **E 14800214 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024** **EP 3066200**

54 Título: **Composiciones y métodos para controlar infestaciones de plagas y parásitos de los artrópodos**

30 Prioridad:

04.11.2013 US 201361899772 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2025

73 Titular/es:

GREENLIGHT BIOSCIENCES, INC. (50.00%)
9 Laboratory Drive, Suite 300
Durham, NC 27709, US y
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF
AGRICULTURE (50.00%)

72 Inventor/es:

INBERG, ALEX;
KAPOOR, MAHAK y
EVANS, JAY

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 008 698 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para controlar infestaciones de plagas y parásitos de los artrópodos

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

- 5 Se proporcionan métodos y composiciones para controlar infestaciones de parásitos y plagas de artrópodos. También se proporcionan métodos y composiciones para controlar la infestación del ácaro *Varroa* en las abejas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 A nivel comercial, la cantidad de artrópodos de diversas especies que se crían está aumentando. Los insectos y sus larvas son nutritivos y se comen crudos o cocidos en muchas culturas. Los crustáceos, como los cangrejos, las langostas, los cangrejos de río, los camarones y los langostinos se crían a gran escala a nivel comercial y conforman una parte importante de la dieta humana. Además de la cría de las especies de artrópodos para la alimentación, los artrópodos también se crían como parte de las estrategias de manejo de plagas, incluido para el control biológico de otros artrópodos, por ejemplo, la cría de avispa parásita para el control de las cucarachas y de las hormigas de fuego. Los artrópodos también pueden servir como fuente de materias primas, por ejemplo, tintas, fármacos, medicamentos y antibióticos. Junto con la creciente importancia de la cría de artrópodos, también están creciendo diversas plagas y parásitos que destruyen las colonias de artrópodos o que reducen considerablemente el rendimiento de los productos obtenidos a partir de la cría de artrópodos. En consecuencia, existe una creciente necesidad de métodos para controlar las plagas y los parásitos de los artrópodos.

- 20 Una de las especies más importantes de artrópodo que se cría es la abeja melífera. Las abejas melíferas, *Apis mellifera*, son necesarias para la polinización efectiva de los cultivos y, por lo tanto, son fundamentales para la agricultura mundial. Las abejas melíferas también producen productos importantes desde el punto de vista económico, incluida la miel y la cera de abeja. Las abejas melíferas son susceptibles a numerosos parásitos y patógenos, incluido el ácaro ectoparásito, *Varroa destructor*.

- 25 Los ácaros *Varroa* (*Varroa destructor*) son los principales parásitos de las abejas melíferas que se manejan (*Apis mellifera*) y son la mayor amenaza a nivel mundial para la apicultura comercial (Rosenkranz et al. 2010). Los ácaros adultos típicamente ingresan en las celdas de cría de las obreras y los zánganos antes de que se operculen, cebados por la feromona de la camada de abejas melíferas. El ácaro se sumerge en el alimento larval que las abejas colocan dentro de la celda anticipándose al operculado, muy probablemente, para evitar que las abejas nodrizas los reconozcan y los retiren. Después del operculado de las celdas de cría por las abejas nodrizas, el ácaro se adhiere a la larva y comienza a ingerir hemolinfa de las larvas de abejas. Este proceso fomenta la ovogénesis en los ácaros y se continúa, varios días después, en la postura de huevos masculinos y femeninos. Eventualmente, el *Varroa* adulto sale de la celda y se aferra a las abejas emergentes. Los *Varroa* dañan directamente a las abejas melíferas de muchas maneras, principalmente agotando los recursos, afectando negativamente el sistema inmunitario de las abejas melíferas innato y porque es un vector muy eficaz de virus (Di Prisco et al., 2011), algunos de los cuales se sabe que se replican en el ácaro y aumentan drásticamente así la carga viral.

- 40 Una solución segura, eficaz y duradera al problema del *Varroa* es un desafío continuo que aún debe solucionarse. Actualmente, los apicultores utilizan una gran cantidad de métodos para controlar los niveles de *Varroa* que incluyen diversos acaricidas químicos, la mayoría de los cuales han perdido eficacia y son tóxicos y/o dejan residuos en la cera y en la miel. Otros métodos incluyen la aplicación de ácido oxálico o fórmico, monoterpenos (timol) y muchas otras prácticas de manejo, con resultados altamente variables, incluida la toxicidad para las colonias tratadas.

También se ha utilizado el ataque a diversos genes de *Varroa* con ácidos nucleicos de doble cadena para tratar colonias de abejas (WO2013153553).

- 45 La cría de abejas con resistencia a *Varroa*, por ejemplo, la selección para un comportamiento higiénico que produzca la eliminación de la cría infestada, ha presentado un éxito limitado en la práctica.

- 50 El problema de colapso de colonias (CCD) de las abejas melíferas está amenazando con aniquilar la agricultura de Estados Unidos y de todo el mundo. De hecho, en el brote reciente de CCD en EUA en el invierno de 2006-2007, se perdió aproximadamente el 25 % o más de los 2,4 millones de colmenas de abejas melíferas debido al CCD. Aproximadamente el 23 % de las operaciones de apicultura en Estados Unidos sufrió el CCD en el invierno de 2006-2007, lo que afectó un promedio del 45 % de las operaciones de apicultura. En el invierno de 2007-2008, el grupo de acción contra el CCD de la USDA-ARS calculó que un total del 36 % de todas las colmenas de las operaciones comerciales fueron destruidas por el CCD.

- 55 El CCD se caracteriza por la rápida pérdida de la población de abejas adultas de una colonia, las abejas adultas suelen encontrarse muertas a cierta distancia de la colonia. En las etapas finales del colapso, una reina es atendida solo por algunas pocas abejas adultas recién surgidas. Las colonias colapsadas suelen tener reservas

considerables de alimento y de crías operculadas. El fenómeno del CCD se informó por primera vez en 2006; sin embargo, los apicultores ya habían detectado disminuciones de colonias únicas consistentes con el CCD en 2004. Diversos factores como los ácaros y los agentes infecciosos, los patrones climáticos, la radiación electromagnética (antenas celulares), los pesticidas, la mala nutrición y el estrés se han mencionado como posibles causas. Hasta la fecha, el control del CCD se ha centrado en el control del ácaro *Varroa*, la higienización y la extracción de las colmenas afectadas, el tratamiento de infecciones oportunistas (como Nosema) y una mejora de la nutrición. Hasta la fecha, no se han desarrollado medidas preventivas eficaces.

Los ácaros *Varroa* parasitan a las pupas y a las abejas adultas y se reproducen en las celdas de cría de las pupas. Los ácaros utilizan la boca para perforar el exoesqueleto y alimentarse de la hemolinfa de las abejas. Estos sitios de heridas en el exoesqueleto albergan infecciones bacterianas, como *Melissococcus pluton*, que provoca la loque europea. Además de los efectos parasitarios, se sospecha que los ácaros *Varroa* actúan como vectores para numerosos patógenos de las abejas melíferas, incluido el virus de las alas deformadas (DWV), el virus Cachemira de la abeja (KBV), el virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV) y el virus de las celdas reales negras (BQCV) y pueden debilitar los sistemas inmunitarios de sus hospedadores, dejándolos vulnerables a las infecciones. Si las infestaciones de *Varroa* no se tratan, típicamente provocan mortalidad a nivel de la colonia.

Se está demostrando que los métodos actuales para tratar las infestaciones de *Varroa* son ineficaces, ya que los ácaros desarrollan resistencia a los acaricidas actuales. Además, el uso de dichos acaricidas puede introducir químicos perjudiciales en la miel destinada al consumo humano.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente divulgación proporciona e incluye composiciones acaricidas selectivas que comprenden una molécula de ácido nucleico acaricida que tiene una secuencia que es esencialmente complementaria o esencialmente idéntica a una región de una secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor* o un ARN transcrito a partir de la misma, en donde dicha composición es ingerible o absorbible por los ácaros. En algunos aspectos, la composición comprende además un excipiente.

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico en la composición insecticida selectiva es un ARNbc. En algunos aspectos, el ARNbc es un ARNip.

En un aspecto, la secuencia del gen de calmodulina tiene al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-4, 6, 23, 26-35 y 69-89. En algunos aspectos, la secuencia del gen de calmodulina comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-4, 6, 23, 26-35 y 69-89.

En un aspecto, la composición acaricida selectiva comprende además una o más moléculas de ácido nucleico acaricida, antiplagas o insecticidas que son esencialmente complementarias o esencialmente idénticas a una primera región de una secuencia del gen de calmodulina. En algunos aspectos, la o las moléculas de ácido nucleico comprenden una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a una segunda región de una secuencia del gen de calmodulina.

En un aspecto, la composición insecticida selectiva es ingerible por las abejas, absorbible por las abejas, ingerible por los ácaros o absorbible por los ácaros.

En un aspecto, el excipiente se selecciona del grupo que consiste en proteína, polen, carbohidrato, polímero, disolvente líquido, jarabe de azúcar, sólido de azúcar y alimento semisólido. En algunos aspectos, el disolvente líquido se selecciona del grupo que consiste en solución de sacarosa y solución de jarabe de maíz. En algunos aspectos, la proteína se selecciona del grupo que consiste en polen y proteína de soja. En otro aspecto, el excipiente es un sólido seleccionado de azúcar, un sustituto del azúcar o un complemento del azúcar. En algunos aspectos, el sólido de azúcar comprende micropartículas de azúcar impregnadas con una secuencia de ácido nucleico de ARNbc.

En un aspecto, la presente solicitud describe composiciones ingeribles por abejas que comprenden una alimentación para abejas y una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una o más regiones de una secuencia del gen de calmodulina o un ARN transcrito de esta. En algunos aspectos, la alimentación para abejas comprende un alimento para abejas seleccionado del grupo que consiste en jarabe de maíz, un sustituto del polen, polen, una empanada de polen y un fondant. En algunos aspectos, la alimentación de la abeja comprende además uno o más de una sal mineral, un aceite esencial, levadura de cerveza, extracto de levadura, trehalosa, triptona, leche deshidratada, lecitina y vitamina C. Algunos ejemplos de aceites esenciales incluyen, entre otros, aceite de gaulteria, aceite de menta verde, aceite de menta, aceite de citronela y aceite de árbol de té.

En otro aspecto, la presente solicitud divulga una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico acaricida que es esencialmente idéntica o complementaria a una región de una secuencia del gen de calmodulina, o un ARN transcrito de esta, unida operativamente a una secuencia promotora

funcional en una célula huésped y capaz de producir un ARNbc cuando se introduce en dicha célula huésped. En algunos aspectos, la construcción de ácido nucleico además comprende al menos un elemento regulador seleccionado del grupo que consiste en secuencias líderes de traducción, intrones, potenciadores, estructuras tallo-bucle, secuencias de unión represoras, secuencias de terminación, secuencias de pausa y secuencias de reconocimiento de poliadenilación. En algunos aspectos, la célula hospedadora es una célula bacteriana o de levadura.

En otro aspecto, la presente solicitud describe un método para proporcionar una composición a una abeja melífera, que comprende proporcionarle a la abeja una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico acaricida que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a una o más regiones de una secuencia del gen de calmodulina, o un ARN transcrito de esta, mediante lo cual el ácido nucleico está presente en el tejido de la abeja melífera.

En otro aspecto, la presente solicitud describe un método para tratar o prevenir una enfermedad en una colonia de abejas melíferas, que comprende proporcionarle a la abeja una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico acaricida que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a una o más regiones de una secuencia del gen de calmodulina a una abeja melífera, mediante lo cual el ácido nucleico está presente en el tejido de la abeja melífera. En algunos aspectos, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor*.

En otro aspecto, la presente solicitud describe un método para reducir la parasitación de una abeja mediante *Varroa destructor*, que comprende proporcionarle a la abeja una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico acaricida, en donde el ácido nucleico es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a una o más regiones de una secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor*, o un ARN transcrito de esta, mediante lo cual se reduce la parasitación de la abeja mediante *Varroa destructor*.

En otro aspecto, la presente solicitud describe un método para reducir la carga de parásitos de una colmena de abejas melíferas, que comprende proporcionarle a dicha colmena una cantidad eficaz de un ácido nucleico acaricida que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a una o más regiones de una secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor*, o un ARN transcrito de esta, mediante lo cual se reduce la carga de parásitos de dicha colmena.

En otro aspecto, la presente solicitud describe un método para tratar selectivamente una especie de artrópodo contra *Varroa destructor*, que comprende administrar una cantidad eficaz de un ácido nucleico acaricida que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a una o más regiones de una secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor*, o un ARN transcrito de esta, a una especie de artrópodo.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona y describe un método para tratar o prevenir el problema de colapso de colonias en una colonia de abejas melíferas, que comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición a una colonia de abejas melíferas que comprende una molécula de ácido nucleico acaricida que tiene una secuencia que es esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una o más regiones de una secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor*, mediante lo cual se reduce o se previene el nivel de infestación de *Varroa destructor*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 presenta un árbol filogenético para los genes de *Calmodulina* (CAM) de diferentes especies. El número que antecede inmediatamente al nombre de la especie corresponde a un número de identificación de secuencia (SEQ ID NO).

La figura 2 presenta la tasa de supervivencia de los ácaros expuestos a un ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 (CAM373) en un bioensayo de alimentación directa 3 días después del tratamiento con relación a un control no tratado (CNTR) o una secuencia no específica (SCRAM, SEQ ID NO: 5).

La figura 3A presenta un análisis de expresión de genes cinco días después del tratamiento con un ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 (CAM373) o SEQ ID NO: 4 (CAM186) con respecto a los controles. La figura 3B muestra la tasa de supervivencia de los ácaros expuestos a ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3 (CAM373) y 4 (CAM186) con respecto a los controles.

La figura 4 presenta una carga de ácaros/100 abejas de colmenas tratadas con respecto a los controles no tratados durante un período diferente.

La figura 5 presenta el % de supervivencia de los ácaros tratados con SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 89 con respecto a los no tratados (NTC) el día 5 (D5) o el día 6 (D6) después del tratamiento.

La figura 6 presenta el % de supervivencia de los ácaros tratados con SEQ ID NO: 3 o una mezcla de SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 89 con respecto a los no tratados (NTC) el día 5 (5), el día 6 (6) y el día 7 (7).

La figura 7 presenta la carga de ácaros Varroa/100 abejas de colmenas tratadas con respecto a los controles no tratados durante un período de 17 semanas. Las barras que se encuentran más a la izquierda representan colmenas tratadas con la secuencia no específica (SCRAM, SEQ ID NO: 5), las barras centrales son las colmenas que se dejaron sin tratar y la barra más a la derecha son las colmenas tratadas con SEQ ID NO: 3 (CAM 373).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica. A efectos de la presente descripción, a continuación se definen los siguientes términos.

Se entiende que cualquier número de identificación de secuencia (SEQ ID NO) descrito en la presente solicitud se puede referir a una secuencia de ADN o a una secuencia de ARN, según el contexto en el cual se mencione dicha SEQ ID NO, incluso si dicha SEQ ID NO se expresa solo en un formato de secuencia de ADN o en un formato de secuencia de ARN. Por ejemplo, SEQ ID NO: 1 se expresa en un formato de secuencia de ADN (p. ej., dice T para timina), pero se puede referir a una secuencia de ADN que corresponde a una secuencia de ácido nucleico de calmodulina de *Varroa destructor* maduro o a la secuencia de ARN de una secuencia de ácido nucleico de la molécula de calmodulina de *Varroa destructor* maduro. De forma similar, aunque SEQ ID NO: 3 se expresa en un formato de secuencia de ARN (p. ej., dice U para uracilo), según el tipo real de molécula que se está describiendo, SEQ ID NO: 3 se puede referir o bien a la secuencia de una molécula de ARN que comprende un ARNbc o a la secuencia de una molécula de ADN que corresponde a la secuencia de ARN que se muestra. En cualquier caso, se contemplan moléculas de ADN y de ARN que tienen las secuencias descritas con cualquier sustituto.

Según se emplea aquí, el término “aproximadamente” se refiere a $\pm 10\%$.

Tal como se usa en la presente, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir diversos compuestos, incluido mezclas de estos.

Según se emplea aquí, “esencialmente idéntico” o “esencialmente complementario” se refiere a un ácido nucleico (o al menos a una cadena de un ácido nucleico de cadena doble o a una parte de este, o a una parte de un ácido nucleico de cadena simple) que se hibrida en condiciones fisiológicas con el gen endógeno, un ARN transcrito de este, o un fragmento de este, para efectuar la regulación o la supresión del gen endógeno. Por ejemplo, en algunos aspectos, un ácido nucleico tiene identidad de secuencia del 100 por ciento o al menos aproximadamente del 83, del 84, del 85, del 86, del 87, del 88, del 89, del 90, del 91, del 92, del 93, del 94, del 95, del 96, del 97, del 98 o del 99 por ciento en comparación con una región de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En algunos aspectos, un ácido nucleico tiene complementariedad de secuencia del 100 por ciento o al menos aproximadamente del 83, del 84, del 85, del 86, del 87, del 88, del 89, del 90, del 91, del 92, del 93, del 94, del 95, del 96, del 97, del 98 o del 99 por ciento en comparación con una región de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En algunos aspectos, un ácido nucleico tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia o de complementariedad con un alelo o un miembro de la familia de un determinado gen diana (secuencia codificante o no codificante de un gen). En algunos aspectos, un ácido nucleico tiene al menos aproximadamente el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento de identidad de secuencia o complementariedad con múltiples alelos o con miembros de la familia de un determinado gen diana. En algunos aspectos, un ácido nucleico tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia o de complementariedad con múltiples alelos o con miembros de la familia de un determinado gen diana.

En algunos aspectos, el ácido nucleico es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos aproximadamente el 10, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 45, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70 o más nucleótidos contiguos de un gen de calmodulina endógeno de una plaga diana, o un ARN transcrito de este. El ácido nucleico puede ser un ADN de cadena simple, un ARN de cadena simple, un ARN de cadena doble, un ADN de cadena doble o un híbrido de ADN/ARN de cadena doble. En algunos aspectos, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor*. En un aspecto, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina seleccionada de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina seleccionada de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina seleccionada de SEQ ID NO: 3. En un aspecto, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina seleccionada de SEQ ID NO: 4. En un aspecto, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina seleccionada de SEQ ID NO: 69. En un aspecto, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina seleccionada de SEQ ID NO: 70. En un aspecto, la

secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina seleccionada de SEQ ID NO: 88. En un aspecto, la secuencia del gen de calmodulina es una secuencia del gen de calmodulina seleccionada de SEQ ID NO: 89.

5 Según se emplea aquí, el término “tratar” incluye abrogar, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir el avance de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente el aspecto de los síntomas clínicos o estéticos de una afección. En un aspecto de acuerdo con la presente descripción, se puede utilizar una composición para tratar un organismo o una colonia de organismos en cuanto a los efectos de *Varroa destructor*.

10 Según se emplea aquí, la expresión “silenciamiento del ARN” se refiere a un grupo de mecanismos reguladores (p. ej., interferencia de ARN (iARN), silenciamiento génico transcripcional (TGS), silenciamiento génico postraducciona (PTGS), extinción, cosupresión y represión traduccional) mediados por moléculas de ARN que producen la inhibición o el “silenciamiento” de la expresión de un gen codificante de proteína correspondiente o secuencia de ARN del patógeno de la abeja. El silenciamiento de ARN se ha observado en muchos tipos de
15 organismos, incluidas plantas, animales y hongos. En los aspectos relacionados con la presente descripción, las composiciones de ácido nucleico proporcionan el silenciamiento de ARN. En determinados aspectos, las composiciones de ácido nucleico proporcionan el silenciamiento y la mortalidad del ARN en un parásito.

Según se emplea aquí, el término “agente de silenciamiento de ARN” se refiere a un ácido nucleico que es capaz de inhibir o “silenciar” la expresión de un gen diana. En determinados aspectos, el agente de
20 silenciamiento de ARN puede evitar el procesamiento completo (p. ej., la traducción y/o la expresión completa) de una molécula de ARNm a través de un mecanismo de silenciamiento postraducciona. Los agentes de silenciamiento del ARN pueden ser ARN de cadena simple o de cadena doble, ADN de cadena simple o de cadena doble o híbridos de ADN/ARN de cadena doble o análogos modificados de estos. En algunos aspectos, los agentes de silenciamiento del ARN se seleccionan del grupo que consiste en (a) una molécula de ARN de
25 cadena simple (ARNmc), (b) una molécula de ARNmc que se autohíbrida para formar una molécula de ARN de cadena doble, (c) una molécula de ARN de cadena doble (ARNbc), (d) una molécula de ADN de cadena simple (ADNmc), (e) una molécula de ADNmc que se autohíbrida para formar una molécula de ADN de cadena doble y (f) una molécula de ADN de cadena simple que incluye un gen Pol III modificado que se transcribe a una molécula de ARN, (g) una molécula de ADN de cadena doble (ADNbc), (h) una molécula de ADN de cadena
30 doble que incluye un promotor Pol III modificado que se transcribe a una molécula de ARN, (i) una molécula de ARN/ADN hibridada de cadena doble o combinaciones de estas. En algunos aspectos, estos polinucleótidos incluyen nucleótidos modificados químicamente o nucleótidos no canónicos. En algunos aspectos, los agentes de silenciamiento de ARN son moléculas de ARN no codificantes, por ejemplo, dúplex de ARN que comprenden cadenas emparejadas, así como ARN precursores a partir de los cuales se pueden generar dichos ARN
35 pequeños no codificantes. En algunos aspectos, los agentes de silenciamiento de ARN son ARNbc como ARNip, ARNmi y ARNhp. En un aspecto, el agente de silenciamiento de ARN es capaz de inducir la interferencia de ARN. En otro aspecto, el agente de silenciamiento de ARN es capaz de mediar la represión traduccional. En un aspecto, el agente de silenciamiento de ARN es capaz de inhibir la expresión de un gen de calmodulina. En otro aspecto, el agente de silenciamiento de ARN se puede utilizar en métodos para inhibir la expresión de
40 un gen diana y matar así un organismo diana. En determinados aspectos, el gen diana es un gen de calmodulina y el organismo diana es *Varroa destructor*.

La interferencia de ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postraducciona específico de secuencia en animales mediado por ARN pequeños. El proceso correspondiente en plantas se denomina comúnmente silenciamiento génico postraducciona o silenciamiento de ARN y también se denomina extinción en los hongos.
45 Sin limitarse por ninguna teoría en particular, se piensa que el proceso de silenciamiento génico postraducciona es un mecanismo de defensa celular conservado por evolución utilizado para evitar la expresión de genes extraños y es compartido comúnmente por una diversidad de flora y filos. Dicha protección de la expresión de genes extraños puede haber evolucionado en respuesta a la producción de ARN de cadena doble (ARNbc) derivado de la infección viral o de la integración aleatoria de elementos transposones en un genoma
50 hospedador a través de una respuesta celular que destruye específicamente el ARN de cadena simple homólogo o el ARN genómico viral. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una composición de ácido nucleico produce la interferencia de ARN en un organismo diana. En determinados aspectos, la composición de ácido nucleico produce la interferencia de ARN en *Varroa destructor*, cuando está presente en el organismo hospedador, la abeja. De acuerdo con los aspectos de la presente descripción, un insecticida selectivo puede provocar interferencia de ARN en el organismo diana, aunque no tenga actividad de interferencia de ARN en los organismos no diana.
55

Según se utiliza aquí, “ARN pequeño” se refiere a cualquier molécula de ARN que tenga una longitud de al menos 15 pares de bases, generalmente 15-30 nucleótidos de longitud, preferentemente 20-24 nucleótidos de longitud. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, un “ARN pequeño” tiene una longitud mayor que 50 pares de bases. En un aspecto, el ARN pequeño tiene una longitud mayor que 50 pares de bases, pero menor que aproximadamente 500 pares de bases. En un aspecto, el ARN pequeño tiene una longitud mayor que 100 pares de bases, pero menor que aproximadamente 500 pares de bases. En un aspecto,
60

el ARN pequeño tiene una longitud mayor que 200 pares de bases, pero menor que aproximadamente 500 pares de bases. Un ARN pequeño puede ser de cadena simple o de cadena doble. Los ARN pequeños incluyen, sin limitación, ARNmi (ARNmicro), ARNip-at (ARNip activador trans), ARNip, ARN activador (ARNa), ARNip-nat (ARNip antisentido natural), ARNip-hc (ARNip heterocromático), ARNip de acción cis, ARNmil (ARNmi largo), ARNipI (ARNip largo) y ARNipae (ARNip activado epigenéticamente) y sus respectivos precursores. En algunas realizaciones, las moléculas de ARNip de la descripción son las moléculas de ARNmi, las moléculas de ARNip-at y las moléculas de ARNa y sus respectivos precursores. Un ARN pequeño se puede procesar *in vivo* por un organismo a una forma activa. De acuerdo con los aspectos de la presente descripción, un insecticida selectivo puede ser un ARN pequeño.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, un ARN pequeño se proporciona directamente en una composición. En otros aspectos, un ARN pequeño es producido *in vivo* por un organismo de un precursor de ARN o de ADN. En algunos aspectos, el ARN pequeño es producido como un producto de un transgen en un organismo, por ejemplo, una célula bacteriana o de levadura. En determinados aspectos, un ARN pequeño producido como un producto de un transgen es producido como un precursor que es procesado *in vivo* después de la ingesta o absorción por un organismo. En otros aspectos, un ARN pequeño producido como un producto de un transgen es producido como un precursor que es procesado *in vivo* después de la ingesta o absorción por un organismo.

En algunos aspectos, el agente de silenciamiento de ARN puede ser un ARNmico artificial. Según se utiliza aquí, un "ARNmico artificial" (ARNmia) es un tipo de ARNmi que es derivado por el reemplazo de dúplex de ARNmi nativos de un precursor de ARNmi natural. En general, un ARNmi artificial es una molécula de ARNmi que no existe en la naturaleza, producida a partir de un andamiaje de molécula de ARNmi previo modificado genéticamente mediante el intercambio de una secuencia de ARNmi de una molécula de ARNmi previa que existe en la naturaleza por una secuencia de interés que corresponde a la secuencia de un ARNmi artificial. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una composición de ácido nucleico puede ser una composición de ARNmia.

Diversos estudios demuestran que los ARNbc largos se pueden utilizar para silenciar la expresión de genes sin inducir la respuesta a la tensión o provocar efectos fuera del objetivo significativos, véase por ejemplo (Strat et al., Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 13 3803-3810; Bhargava A et al. Brain Res. Protoc. 2004;13:115-125; Diallo M., et al., Oligonucleotides. 2003;13:381-392; Paddison P.J., et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002;99:1443-1448; Tran N., et al., FEBS Lett. 2004;573:127-134). La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones que tienen ARNbc largos.

Según se utiliza aquí, con respecto a una secuencia de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico o un gen, el término "natural" o "nativo" significa que la secuencia o molécula respectiva está presente en un organismo salvaje, que no ha sido modificada o manipulada genéticamente por el hombre. Una molécula de ARN pequeño dirigida naturalmente a un gen diana significa una molécula de ARN pequeño presente en un organismo salvaje, la célula no ha sido modificada o manipulada genéticamente por el hombre, que se dirige a un gen diana que está presente naturalmente en el organismo respectivo.

Según se emplean aquí, los términos "homología" e "identidad", cuando se utilizan con relación a los ácidos nucleicos, describen el grado de similitud entre dos o más secuencias de nucleótidos. El porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, de modo que la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones en las cuales la base de ácido nucleico o el residuo de aminoácido idéntico aparece en ambas secuencias para dar la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo la cantidad de posiciones coincidentes entre la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Se dice que una secuencia que es idéntica en todas las posiciones en comparación con una secuencia de referencia es idéntica a la secuencia de referencia y viceversa. Se puede realizar una alineación de dos o más secuencias utilizando cualquier programa informático adecuado. Por ejemplo, un programa informático muy utilizado y aceptado para realizar alineaciones de secuencias es CLUSTALW v1.6 (Thompson et al. Nucl. Acids Res., 22: 4673-4680, 1994).

Según se emplean aquí, los términos "polinucleótido exógeno" y "molécula de ácido nucleico exógena", con relación a un organismo, se refieren a una secuencia de ácido nucleico heteróloga que no se expresa naturalmente dentro de dicho organismo. Una molécula de ácido nucleico exógena se puede introducir en un organismo de una forma estable o transitoria. Una molécula de ácido nucleico exógena puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es idéntica o parcialmente homóloga a una secuencia de ácido nucleico endógena del organismo o una plaga o patógeno de dicho organismo. En determinados aspectos, un "polinucleótido exógeno" y una "molécula de ácido nucleico exógena" se puede referir a una secuencia de ácido nucleico de parásito expresada o presente en un hospedador, ya sea de forma transitoria o estable. La presente descripción proporciona e incluye composiciones que comprenden polinucleótidos exógenos y moléculas de

ácido nucleico exógenas y métodos para introducirlas en un organismo diana. En algunos aspectos, la presente descripción proporciona e incluye composiciones que comprenden polinucleótidos exógenos y moléculas de ácido nucleico exógenas y métodos para introducirlas en un organismo no diana que es un hospedador del organismo diana.

5 Según se emplea aquí, un “organismo de control” significa un organismo que no contiene el ADN recombinante, ARN pequeño u otro ácido nucleico (p. ej., proteína, ARNm_i, ARNm diana resistente al ARN pequeño, ARN_{bc}, imitador diana) que proporciona el control de una plaga o parásito. Los organismos de control son generalmente de la misma especie y de la misma etapa de desarrollo que se obtiene en las mismas condiciones de crecimiento que el organismo tratado. De forma similar, una “colonia de control” significa una colonia de
10 organismos que no contienen el ADN recombinante, ARN pequeño u otro ácido nucleico (p. ej., proteína, ARNm_i, ARNm diana resistente al ARN pequeño, imitador diana) que proporciona el control de una plaga o parásito. Las colonias de organismos de control son generalmente de la misma especie y de la misma etapa de desarrollo que se obtiene en las mismas condiciones de crecimiento que la colonia de organismos tratada. Como ejemplo no exhaustivo, un organismo de control puede ser una abeja que recibe una composición que
15 no contiene un ácido nucleico de la presente descripción. En otro ejemplo no exhaustivo, un organismo de control puede ser una abeja que recibe una composición que contiene un ácido nucleico que no actúa como un silenciador de ARN ni en una abeja ni en un parásito, como SEQ ID NO: 5.

Según se utilizan aquí, los términos “mejorar”, “mejorado”, “aumentar” y “aumentado” se refieren a un aumento de al menos aproximadamente el 2 %, al menos aproximadamente el 3 %, al menos aproximadamente el 4 %, al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o mayor en un organismo o población de colonia, en el aumento de la productividad de un organismo o colonia (p. ej., aumento de la producción de miel), aumento de la tasa de crecimiento de un organismo o colonia o aumento de la tasa reproductiva en comparación con un organismo o colonia de control. La presente descripción proporciona métodos para mejorar la salud de un organismo o colonia mediante el suministro de una composición insecticida selectiva.

Según se emplea aquí, “una reducción” del nivel de un agente como una proteína o ARNm significa que el nivel se reduce con respecto a un organismo o colonia que carece de un ácido nucleico capaz de reducir al agente. Además, según se emplea aquí, “una reducción” con referencia a la parasitación o a la carga de parásitos, significa que el nivel se reduce con respecto a un organismo o colonia que carece de un ácido nucleico, como una molécula de ARN_{bc}, capaz de reducir la viabilidad, la fecundidad o la cantidad del parásito. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para reducir el nivel de una proteína o ARNm y reducir el nivel o la cantidad de parásitos.

Según se emplea aquí, el término “al menos una reducción parcial” del nivel de un agente como una proteína o ARNm significa que el nivel se reduce en al menos el 25 % con respecto a un organismo o colonia que carece de un ácido nucleico, como una molécula de ARN_{bc} capaz de reducir al agente. Además, según se emplea aquí, “al menos una reducción parcial” con referencia a la parasitación o a la carga de parásitos, significa que el nivel se reduce al menos el 25 % con respecto a un organismo o colonia que carece de un ácido nucleico, como una molécula de ARN_{bc}, capaz de reducir la viabilidad, la fecundidad o la cantidad del parásito. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para reducir al menos parcialmente el nivel de una proteína o ARNm y reducir al menos parcialmente el nivel o la cantidad de parásitos.

Según se emplea aquí, “una reducción sustancial” del nivel de un agente como una proteína o ARNm significa que el nivel se reduce con respecto a un organismo o colonia que carece de un ácido nucleico, como una molécula de ARN_{bc} capaz de reducir al agente, en donde la reducción del nivel del agente es de al menos el 75 %. Además, según se emplea aquí, “una reducción sustancial” con referencia a la parasitación o a la carga de parásitos, significa que el nivel se reduce al menos el 75% con respecto a un organismo o colonia que carece de un ácido nucleico, como una molécula de ARN_{bc}, capaz de reducir la viabilidad, la fecundidad o la cantidad del parásito. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para reducir sustancialmente el nivel de una proteína o ARNm y reducir sustancialmente el nivel o la cantidad de parásitos.

Según se emplea aquí, “una eliminación eficaz” de un agente como una proteína o ARNm se relaciona con un organismo o colonia que carece de una molécula de ARN_{bc} capaz de reducir el agente, en donde la reducción del nivel del agente es mayor que el 95 %. Un agente, como una molécula de ARN_{bc}, es preferentemente capaz de proporcionar al menos una reducción parcial, más preferentemente una reducción sustancial o, más preferentemente, una eliminación eficaz de otro agente como una proteína o ARNm, o un parásito, en donde el nivel de un segundo agente, u organismo hospedador, resulta esencialmente no afectado, sustancialmente no afectado o parcialmente no afectado por el agente. Además, según se emplea aquí, “una eliminación eficaz” con referencia a la parasitación o a la carga de parásitos, significa que el nivel se reduce al menos el 95 % con respecto a un organismo o colonia que carece de un ácido nucleico, como una molécula de ARN_{bc}, capaz de reducir la viabilidad, la fecundidad o la cantidad del parásito. La presente descripción proporciona e incluye

métodos y composiciones para la eliminación eficaz de una proteína o ARNm y la eliminación eficaz de parásitos.

Según se emplean aquí, los términos “suprimir”, “reprimir” y “regular por disminución”, cuando se refieren a la expresión o actividad de una molécula de ácido nucleico en un organismo, se utilizan de manera equivalente aquí y significan que el nivel de expresión o de actividad de la molécula de ácido nucleico en una célula de un organismo después de aplicar un método de la presente descripción es inferior que la expresión o actividad en la célula de un organismo antes de aplicar el método, o en comparación con un organismo de control que carece de una molécula de ácido nucleico de la descripción. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para suprimir, reprimir y regular por disminución el nivel de una proteína o ARNm y suprimir, reprimir y regular por disminución el nivel o la cantidad de parásitos.

Los términos “suprimido”, “reprimido” y “regulado por disminución”, según se emplean aquí, son sinónimos y significan en el presente menor, preferentemente significativamente menor, expresión o actividad de una molécula de ácido nucleico diana. Además, según se emplea aquí, “suprimido”, “reprimido” y “regulado por disminución”, con referencia a la parasitación o a la carga de parásitos, significa que el nivel de parasitación o la carga de parásitos es menor, preferentemente significativamente menor con respecto a un organismo o colonia que carece de un ácido nucleico, como una molécula de ARNbc capaz de reducir la viabilidad, la fecundidad o la cantidad del parásito. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para suprimir, reprimir y regular por disminución la expresión o la actividad de una proteína o ARNm y suprimir, reprimir y regular por disminución la actividad de los parásitos.

Según se emplean aquí, una “supresión”, “represión” o “regulación por disminución” del nivel o actividad de un agente como una proteína, ARNm o ARN significa que el nivel o la actividad se reduce con respecto a una célula, organismo o colonia sustancialmente idéntico que creció en condiciones sustancialmente idénticas, que carece de una molécula de ácido nucleico de la descripción, por ejemplo, que carece de la región complementaria a al menos una parte de la molécula precursoras de un ARNbc o ARNip, la construcción recombinante o el vector recombinante de la descripción. Según se emplean aquí, una “supresión”, “represión” o “regulación por disminución” del nivel o actividad de un agente, por ejemplo, un ARNpre, ARNm, ARNr, ARNt, ARNsno, ARNsn expresado por el gen diana, y/o del producto de proteína codificado por este, significa que la cantidad se reduce en el 10 % o más, por ejemplo, el 20 % o más, preferentemente el 30 % o más, más preferentemente el 50 % o más, más preferentemente el 70 % o más, más preferentemente el 80 % o más, por ejemplo, el 90 %, con respecto a una célula, organismo o colonia que carece de una molécula de ácido nucleico recombinante de la descripción. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para la supresión, represión y regulación por disminución de un agente como una proteína, ARNm, ARN o parásito comparado con un organismo o colonia no tratado.

Según se emplea aquí, el término “ artrópodo ” se refiere a los adultos y a las pupas de animales invertebrados que tienen un exoesqueleto (esqueleto externo), un cuerpo segmentado y apéndices articulados. Los artrópodos son miembros del filo Arthropoda e incluye insectos, arácnidos y crustáceos. Los artrópodos de acuerdo con la presente descripción incluyen, entre otros, *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Trigona minima*, *Halictidae*, *Bombus sp.*, pulgas, moscas, piojos, garrapatas, ácaros e insectos beneficiosos. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para tratar artrópodos como hospedadores o como un parásito o plaga.

En un aspecto, un artrópodo puede ser un insecto. En determinados aspectos, un insecto puede ser una abeja. Según se emplea aquí, el término “abeja” se refiere a una abeja adulta y a las células de las pupas de estas. De acuerdo con un aspecto, la abeja se encuentra en una colmena. Una abeja adulta se define como cualquiera de diversos insectos alados, con pelos en el cuerpo, que generalmente pican, de la superfamilia Apoidea en el orden Hymenoptera, incluidas las especies solitarias y sociales y caracterizados por tener piezas bucales para chupar y mascar para recolectar néctar y polen. Algunos ejemplos de especies de abejas incluyen, entre otros, *Apis*, *Bombus*, *Trigona*, *Osmia* y similares. En un aspecto, las abejas incluyen, entre otras, abejorros (*Bombus terrestris*), abejas melíferas (*Apis mellifera*) (incluidas las recolectoras y las abejas domésticas) y *Apis cerana*. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para tratar abejas como hospedadores de ácaros Varroa.

De acuerdo con un aspecto, una abeja forma parte de una colonia. El término “colonia” se refiere a una población de abejas que comprende entre docenas y típicamente varias decenas de miles de abejas que colaboran con la construcción del nido, la recolección de alimento y la cría de pollo. Una colonia normalmente tiene una única reina, el resto de las abejas son “obreras” (hembras) o “zánganos” (machos). La estructura social de la colonia es mantenida por la reina y las obreras y depende de un sistema eficaz de comunicación. La división de las tareas dentro de la casta obrera depende principalmente de la edad de la abeja, pero varía con las necesidades de la colonia. La reproducción y la fuerza de la colonia dependen de la reina, de la cantidad de reservas de alimento y del tamaño de la fuerza obrera. Las abejas melíferas también se pueden subdividir en las categorías de “abejas domésticas”, generalmente para la primera parte de la vida de las obreras, durante la cual la “abeja doméstica” realiza tareas dentro de la colmena y “abeja recolectora” durante la última parte de la vida de la abeja, durante la cual la “recolectora” ubica y recolecta polen y néctar del exterior de la colmena y

trae el néctar o el polen a la colmena para consumo y almacenamiento. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para tratar colonias de insectos.

Según se emplea aquí, el término “plaga” se refiere a las formas adultas e inmaduras de un organismo que es invasivo o prolífico, perjudicial, problemático, nocivo, destructivo, una molestia para las plantas o los animales o los ecosistemas. Un parásito es un tipo de plaga. Es posible que un organismo sea una plaga en un entorno, pero que sea beneficioso, domesticado o aceptable en otro.

Según se utiliza aquí, el término “parásito” se refiere a las formas adultas e inmaduras de organismos que se benefician directamente a expensas de otro, organismo hospedador, por ejemplo, alimentándose de la sangre o los fluidos del hospedador, viviendo intracelularmente en una célula del organismo hospedador o viviendo dentro de un cuerpo de un organismo hospedador. Los parásitos incluyen organismos que son animales, hongos, bacterias o plantas y se identifican mediante la interacción negativa o perjudicial con un hospedador. En algunos aspectos, un parásito, según se emplea aquí, puede a su vez servir como hospedador para un segundo parásito. En algunos aspectos, un parásito y un hospedador pueden ser del mismo tipo de organismo (p. ej., un hospedador artrópodo y un parásito artrópodo). Los parásitos incluyen, entre otros, *Acari* (garrapatas, ácaros), *Hippoboscoidea* (moscas), *Ichneumonoidea* (avispa parásita), *Oestridae* (tábanos), *Phthiraptera* (piojos), *Siphonaptera* (pulgas), *Tantulocarida*, cangrejo de los mejillones y *Sacculina*. Según se utiliza aquí, una plaga puede incluir etapas de la vida parasitarias y no parasitarias. La presente descripción proporciona e incluye métodos y composiciones para tratar parásitos. En un aspecto, el parásito puede ser *Varroa destructor*.

Según se proporciona y se incluye en la presente descripción, los parásitos y/o las plagas incluyen *Varroa destructor*, *Ixodes scapularis*, *Solenopsis invicta*, *Tetranychus urticae*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Acyrtosiphon pisum* y *Pediculus humanus*. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, los insecticidas selectivos pueden ser selectivos para *Varroa destructor*, e inactivos, o significativamente menos activos, contra un organismo no diana como el organismo hospedador.

Según se utiliza aquí, el término “excipiente” se refiere a cualquier sustancia inactiva en una formulación que tiene un ingrediente activo como un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida, incluido, entre otros, ARNbc, ARN pequeño, ARNmi y ARN antisentido. En algunas realizaciones, un excipiente incluye sustancias que pueden proporcionar funcionalidad adicional a una composición, que es diferente de los ácidos nucleicos antiparasitarios, antiplagas o insecticidas. Las funciones de los excipientes incluyen, entre otras, “agentes espesantes”, “rellenos”, “diluyentes” y “portadores”. El espesado permite una dispensación conveniente y precisa de las composiciones de la presente descripción. Los excipientes también pueden servir para facilitar la ingesta de las composiciones por organismos e incluye diversos carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, polen y sustitutos del polen. Los excipientes también pueden servir para facilitar la absorción de composiciones por organismos e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas y no acuosas de ingredientes activos. Algunos ejemplos no taxativos de excipientes incluyen jarabe de maíz, jarabe de azúcar, sólidos de azúcar, semisólidos de azúcar, polen, proteína de soja, mezclas de polen y proteína. Los excipientes también pueden comprender atrayentes, amortiguadores y suplementos nutricionales. Las composiciones de la presente descripción pueden estar recubiertas, encapsuladas, disueltas, en mezclas o combinadas de otro modo con un excipiente. Según se emplea aquí, el término excipiente se puede referir a una mezcla de sustancias inactivas.

La presente solicitud proporciona y describe moléculas de ácido nucleico antiparasitarias, antiplagas o insecticidas que son sustancialmente homólogas o complementarias con una secuencia de polinucleótidos de un gen diana de calmodulina o un ARN expresado a partir del gen diana de calmodulina o un fragmento de este y que suprimen la expresión del gen diana de calmodulina o producen un fenotipo de inactivación. Las moléculas de ácido nucleico antiparasitarias, antiplagas o insecticidas son capaces de inhibir o “silenciar” la expresión de un gen diana de calmodulina. Estas moléculas de ácido nucleico se describen generalmente con relación a su “secuencia diana”. En la presente divulgación, la secuencia diana se selecciona de SEQ ID NO. 1, 2 y 6-77. Las moléculas de ácido nucleico antiparasitarias, antiplagas o insecticidas pueden ser un ADN de cadena simple (ADNmc), ARN de cadena simple (ARNmc), ARN de cadena doble (ADNbc), ADN de cadena doble (ADNbc) o híbridos de ADN/ARN de cadena doble. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender nucleótidos naturales, nucleótidos modificados, análogos de nucleótidos o cualquier combinación de estos. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida se puede incorporar dentro de un polinucleótido más grande, por ejemplo, en una molécula ARNmi pri. En algunas realizaciones, se puede procesar una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida para obtener un ARN interferente pequeño (ARNip). En la presente divulgación, se proporcionan o se describen moléculas de ácido nucleico que son selectivamente antiparasitarias o acaricidas, y métodos para modular la expresión o la actividad de sus genes diana para reducir o eliminar parásitos de una colonia o población.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 %, el 85 %, el 88 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia o una parte de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 89. En determinados aspectos, la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADNmc, ARNmc, ADNbc, ADNbc o híbridos de ADN/ARN. Diversas realizaciones se refieren a un ARNbc que comprende una secuencia

de nucleótidos que tiene al menos el 80 %, el 85 %, el 88 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia o una parte de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 89. En otro aspecto, se proporciona un ADN que codifica al menos un ácido nucleico, como un ARNmc o un ARNbc, que comprende una secuencia de nucleótidos o una parte de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 89, o que tiene al menos el 80 %, el 85 %, el 88 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 a 89 o una parte de esta. En otro aspecto, se proporcionan un ADN recombinante que codifica al menos un ácido nucleico, como un ARNmc o ARNbc, que comprende una secuencia de nucleótidos o una parte de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 89, un promotor heterólogo y una secuencia terminadora de transcripción. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un ADN recombinante que codifica al menos un ácido nucleico, como un ARNmc o ARNbc, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 %, el 85 %, el 88 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia o una parte de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 89 y que además comprende un promotor heterólogo y un terminador de transcripción.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 10 a 17 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 18 a 25 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 20 a 30 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 25 a 35 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 30 a 40 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 40 a 50 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 50 a 60 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de hasta 60 nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de hasta 50 nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de hasta 40 nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 25 nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 35 nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 40 nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 50 nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 60 nucleótidos contiguos en el gen diana o ARN transcrito del gen diana. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 1 a 89. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 2. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 3. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 4. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 69. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 70. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 88. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 89. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 6-68.

[illegible]

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una composición comprende una molécula de

[illegible]

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 10 a 17 o más nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 18 a 25 o más nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 20 a 30 o más nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 25 a 35 o más nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 30 a 40 o más

- nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 40 a 50 o más nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 50 a 60 o más nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de hasta 60 nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de hasta 50 nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de hasta 40 nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 25 nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 40 nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 50 nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 60 nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En algunos aspectos, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 98 por ciento de identidad de secuencia con una región del gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 97 por ciento de identidad de secuencia con una región del gen diana. En algunos aspectos, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 96 por ciento de identidad de secuencia con una región del gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 95 por ciento de identidad de secuencia con una región del gen diana. En algunos aspectos, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 94 por ciento de identidad de secuencia con una región del gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 93 por ciento de identidad de secuencia con una región del gen diana. En algunos aspectos, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 92 por ciento de identidad de secuencia con una región del gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 91 por ciento de identidad de secuencia con una región del gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos aproximadamente el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90 por ciento de identidad con una región del gen diana como se proporcionó anteriormente. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 1 a 89. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 2. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 3. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 4. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 69. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 70. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 88. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 89. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 6-68.
- En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 10 a 17 o más nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 18 a 25 o más nucleótidos contiguos a un alelo o un miembro de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de 20 a 30 o más nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 100 por ciento de identidad de secuencia con una región de

[illegible]

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 10 a 17 o más nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 18 a 25 o más nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 20 a 30 o más nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 25 a 35 o más nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 30 a 40 o más nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 40 a 50 o más nucleótidos contiguos

de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 50 a 60 o más nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de 45 a 60 o más nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de hasta 60 nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de hasta 50 nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de hasta 40 nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 25 nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 35 nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 40 nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 50 nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En un aspecto, una composición comprende una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida que tiene el 99 por ciento de identidad de secuencia con una región de al menos 60 nucleótidos contiguos de identidad o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen diana determinado. En algunos aspectos, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 98 por ciento de identidad de secuencia con una región de un gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 97 por ciento de identidad de secuencia con una región de un gen diana. En algunos aspectos, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 96 por ciento de identidad de secuencia con una región de un gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 95 por ciento de identidad de secuencia con una región de un gen diana. En algunos aspectos, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 94 por ciento de identidad de secuencia con una región de un gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 93 por ciento de identidad de secuencia con una región de un gen diana. En algunos aspectos, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 92 por ciento de identidad de secuencia con una región de un gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos el 91 por ciento de identidad de secuencia con una región de un gen diana. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida tiene al menos aproximadamente el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90 por ciento de identidad con una región de un gen diana como se proporcionó anteriormente. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 1 a 89. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 2. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 3. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 4. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 69. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 70. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 88. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende la SEQ ID NO: 89. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, un gen diana puede ser un gen que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 6-68.

La presente solicitud proporciona y describe composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida y una sustancia excipiente. En un aspecto, el excipiente puede ser una combinación de uno o más componentes inactivos. En algunos aspectos, el excipiente comprende un azúcar. Algunos ejemplos de azúcares incluyen hexosas, disacáridos, trisacáridos y azúcares superiores. Los azúcares excipientes incluyen, por ejemplo, fructosa, glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, galactosa, ribosa. En otros aspectos, el excipiente comprende un azúcar y un disolvente. En otros aspectos, el excipiente comprende una proteína. En un aspecto, la proteína es una proteína de soja. En otros aspectos, el excipiente puede ser polen. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, el excipiente puede ser un alimento para abejas. En algunos aspectos, el excipiente comprende triptona. En algunos aspectos, el excipiente comprende extracto de levadura. En algunos aspectos, el excipiente comprende un aceite esencial.

La alimentación de las abejas es una práctica común entre los apicultores para cubrir las necesidades nutricionales y de otro tipo, por ejemplo, complementarias. Las abejas típicamente se alimentan de miel y polen, pero se sabe que también ingieren alimentos no naturales. Las abejas pueden consumir diversos productos comestibles incluidos, entre otros, Wheast (una levadura láctea cultivada en el queso cottage), harina de soja, levadura (p. ej., levadura de cerveza, levadura torula) y productos de levadura administrados solos o en combinación y harina de soja administrada como una mezcla seca o como una torta húmeda dentro de la colmena o como una mezcla seca en los alimentadores abiertos fuera de la colmena. También es útil el azúcar o un jarabe de azúcar. El añadido del 10 al 12 por ciento de polen a un suplemento administrado a las abejas mejora la palatabilidad. El añadido del 25 por ciento de polen mejora la calidad y la cantidad de los nutrientes esenciales que necesitan las abejas para la actividad vital. El azúcar de caña o de remolacha, el jarabe de maíz isomerizado y el jarabe de azúcar tipo 50 son sustitutos satisfactorios para la miel en la dieta natural de las abejas melíferas. Los últimos dos solo se pueden administrar en forma líquida a las abejas. La alimentación líquida se puede suministrar a las abejas dentro de la colmena mediante, por ejemplo, cualquiera de los siguientes métodos: cubeta superior de fricción, panales dentro del cuerpo de colmena, alimentador de tablero divisor, alimentador Boardman, etc. El azúcar seco se puede administrar colocando una libra o dos sobre la cubierta interior invertida. En todo momento, debe haber un suministro de agua disponible para las abejas. En un aspecto, se prevén bandejas en las cuales haya apoyos flotantes presentes, como virutas de madera, corcho o esponjas de plástico. Descripciones detalladas de alimentos suplementarios para abejas se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación de la USDA de Standifer et al., 1977, titulada "Supplemental Feeding of Honey Bee Colonies" (USDA, Agriculture Information Bulletin No. 413).

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida, por ejemplo, un ARNbc es absorbible. Según se utiliza aquí, "absorbible" se refiere a los mecanismos para proporcionar la absorción de un ácido nucleico que no sea por ingesta. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida se puede absorber a través de la piel de un organismo o el exoesqueleto de un artrópodo. En un aspecto, un ácido nucleico absorbible se disuelve en un excipiente. En otros aspectos, un ácido nucleico absorbible se suspende en un excipiente. Los excipientes para la solvatación o suspensión pueden ser acuosos o no acuosos. En algunos aspectos, el ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida es absorbido por un organismo hospedador y transferido a un organismo parasitario por alimentación. En otros aspectos, el ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida es absorbido por un organismo hospedador y transferido a un organismo parasitario por absorción. En un aspecto, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida de la presente descripción es absorbido directamente por el parásito.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida, por ejemplo, un ARNbc se combina con un excipiente. En un aspecto, el ácido nucleico se puede proporcionar en una proporción de ácido nucleico a excipiente. En un aspecto, la proporción puede ser una parte de ácido nucleico a 4 partes de excipiente. En un aspecto, la proporción de ácido nucleico a excipiente puede ser 1:1, 1:2, 1:5 o 1:10. En otros aspectos, la proporción de ácido nucleico a excipiente puede ser 1:20, 1:25, 1:30, 1:40 o más. En un aspecto, la proporción de ácido nucleico a excipiente puede ser 1:50. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, la proporción se puede determinar como una proporción de volumen a volumen (v/v), una proporción peso:peso (p/p). En determinados aspectos, la proporción se puede expresar como una proporción de peso:volumen (p/v). En determinados aspectos, un ácido nucleico y un excipiente puede ser un ARNbc y un excipiente.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, la composición puede comprender un peso de ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida combinado con un excipiente. En un aspecto, el ácido nucleico puede comprender un porcentaje del peso total de la composición. En un aspecto, el ácido nucleico puede comprender aproximadamente el 0.1 % en peso de la composición. En un aspecto, el ácido nucleico puede comprender aproximadamente el 0.2% en peso de la composición. En un aspecto, el ácido nucleico puede comprender aproximadamente el 0.3% en peso de la composición. En otro aspecto, el ácido nucleico puede comprender aproximadamente el 0.4 % en peso de la composición. En un aspecto, el ácido nucleico puede comprender hasta el 0.5 % en peso de la composición. En un aspecto, el ácido nucleico puede comprender hasta el 0.6% en peso de la composición. En un aspecto, el ácido nucleico puede comprender hasta el 0.7% en peso de la composición. En un aspecto, el ácido nucleico puede comprender hasta el 0.8% en peso de la composición. En otro aspecto, el ácido nucleico puede comprender hasta el 1.0 % en peso de la composición. En otros aspectos, el ácido nucleico puede comprender hasta el 1.5% en peso de la composición. En otros aspectos, el ácido nucleico puede comprender hasta el 2.0 % en peso o el 2.5 % en peso de la composición. En determinados aspectos, un ácido nucleico y un excipiente puede ser un ARNbc y un excipiente.

La presente descripción proporciona e incluye composiciones que tienen entre el 0.1 % y el 5 % en peso de uno o más ácidos nucleicos antiparasitarios, antiplagas o insecticidas. En otros aspectos, una composición puede comprender entre el 0.1 y el 4 %, entre el 0.1 y el 3 %, entre el 0.1 y el 2 %, entre el 0.1 y el 1 %, entre el 0.1 y el 2 %, entre el 0.1 y el 3 % o entre el 0.1 y el 4 % en peso de ácido nucleico. En un aspecto, una composición puede comprender entre el 0.2 % y el 5 % en peso de ácido nucleico. En otros aspectos, una composición puede comprender entre el 0.2 y el 4 %, entre el 0.2 y el 3 %, entre el 0.2 y el 2 %, entre el 0.2 y el 1 %, entre el 0.2 y el 2 %, entre el 0.2 y el 3 % o entre el 0.2 y el 4 % en peso de ácido nucleico. En otros

aspectos, una composición puede comprender hasta el 1 %, hasta el 2 %, hasta el 3 %, hasta el 4 % o hasta el 5 % de ácido nucleico. En otros aspectos, una composición puede comprender hasta el 7.5 %, hasta el 10 % o hasta el 15 % de ácido nucleico. En determinados aspectos, un ácido nucleico y un excipiente puede ser un ARNbc y un excipiente.

- 5 La presente descripción proporciona e incluye composiciones que tienen entre 0.1 y 10 mg/ml de uno o más ácidos nucleicos antiparasitarios, antiplagas o insecticidas. En otros aspectos, una composición puede comprender entre 0.1 y 1.0 mg/ml, 0.1 y 2.0 mg/ml, 0.1 y 2.5 mg/ml, 0.1 y 5 mg/ml, 0.1 y 10 mg/ml, 0.1 y 15 mg/ml o 0.1 y 20 mg/ml de ácido nucleico. En determinados aspectos, una composición puede comprender al menos 0.1 µg/ml de ácido nucleico. En otros aspectos, una composición puede comprender al menos 1.0 µg/ml de ácido nucleico. En otros aspectos, una composición puede comprender al menos 10 µg/ml de ácido nucleico. En un aspecto, una composición puede comprender entre 0.5 y 10 mg/ml de ácido nucleico. En otros aspectos, una composición puede comprender entre 0.5 y 1.0 mg/ml, 0.5 y 2.0 mg/ml, 0.5 y 2.5 mg/ml, 0.5 y 5 mg/ml, 0.5 y 10 mg/ml, 0.5 y 15 mg/ml o 0.5 y 20 mg/ml de ácido nucleico. En un aspecto, una composición puede comprender entre 1.0 y 10 mg/ml de ácido nucleico. En otros aspectos, una composición puede comprender entre 1.0 y 2.0 mg/ml, 1.0 y 2.5 mg/ml, 1.0 y 5 mg/ml, 1.0 y 10 mg/ml, 1.0 y 15 mg/ml o 1.0 y 20 mg/ml de ácido nucleico. En determinados aspectos, el ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida en la composición comprende un ARNbc.

La presente descripción proporciona e incluye composiciones insecticidas selectivas y métodos para utilizar las composiciones insecticidas selectivas.

- 20 Según se emplea aquí, una "composición insecticida selectiva", es una composición que es más eficaz para una o más especies de artrópodos y es menos eficaz para una o más especies de artrópodos diferentes. Una composición insecticida selectiva incluye composiciones que matan a los artrópodos adultos o inmaduros e incluye composiciones que son larvicidas u ovicidas. Un insecticida selectivo puede ser un insecticida sistémico incorporado por alimentos tratados, incluida la sangre o la hemolinfa obtenida de organismos hospedadores. 25 Un insecticida selectivo puede ser un insecticida de contacto, que es tóxico para determinados insectos que se pone en contacto directo y que es no tóxico o mínimamente tóxico para otros insectos. En la presente divulgación, una composición insecticida selectiva es un antiplaga. En algunas realizaciones, una composición insecticida selectiva es un antiparasitario. En algunas realizaciones, una composición insecticida selectiva es un acaricida. En la presente divulgación, una composición insecticida selectiva es tóxica para un insecto parasitario o plaga diana y es no tóxica o mínimamente tóxica para organismos no diana. Algunos ejemplos de organismos no diana incluyen, entre otros, insectos beneficiosos, nematodos, aves, mamíferos y plantas. En la presente divulgación, una composición insecticida selectiva es tóxica para el ácaro Varroa, y es no tóxica o mínimamente tóxica para el organismo hospedador, por ejemplo, las abejas.

- 35 En determinados aspectos de acuerdo con la presente descripción, se puede incorporar un insecticida selectivo en una bacteria o levadura por modificación genética (por ejemplo, una bacteria o levadura transgénica modificada genéticamente para expresar un ácido nucleico de la presente descripción). Un insecticida selectivo introducido mediante modificación genética de una bacteria o levadura puede actuar directamente sobre el organismo plaga o indirectamente al ser ingerido por un hospedador del organismo plaga.

- 40 En un aspecto de acuerdo con la presente descripción, un insecticida selectivo puede ser un insecticida más eficaz contra uno o más insectos primarios que contra uno o más insectos secundarios. En un aspecto, un insecticida selectivo puede ser tóxico para un insecto primario y no tener efecto sobre un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede ser tóxico para un insecto primario y requerir concentraciones o cantidades significativamente mayores para presentar un efecto sobre un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede ser 2 veces más tóxico o más para un insecto primario en comparación con un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede ser 4 veces más tóxico o más para un insecto primario en comparación con un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede ser 5 veces más tóxico o más para un insecto primario en comparación con un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede ser 10 veces más tóxico o más para un insecto primario en comparación con un insecto secundario.

- 50 En un aspecto, un insecticida selectivo puede inhibir el crecimiento, el desarrollo o la fecundidad de un insecto primario y no tener efecto sobre un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede inhibir el crecimiento, el desarrollo o la fecundidad de un insecto primario y requerir concentraciones o cantidades significativamente mayores para presentar un efecto similar sobre un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede requerir 2 veces más o más del ingrediente activo para inhibir el crecimiento, el desarrollo o la fecundidad de un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede requerir 4 veces más o más del ingrediente activo para inhibir el crecimiento, el desarrollo o la fecundidad de un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede requerir 5 veces más o más del ingrediente activo para inhibir el crecimiento, el desarrollo o la fecundidad de un insecto secundario. En un aspecto, un insecticida selectivo puede requerir 10 veces más o más del ingrediente activo para inhibir el crecimiento, el desarrollo o la fecundidad de un insecto secundario.

La presente descripción incluye y proporciona además métodos para tratar o prevenir el problema de colapso de colonias en una colonia de abejas melíferas, que comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a una región de una secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor* a una abeja melífera, mediante lo cual se reduce el nivel de infestación de *Varroa destructor*. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 69. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 19 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 70. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 3. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 4. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 88. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 89. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende dos o más ácidos nucleicos que tienen una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, 4, 88 y 89. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 19 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 23 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 30 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 40 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 50 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 60 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 70 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 80 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 90 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 100 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 110 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 120 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 130 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico que es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a al menos 140 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En un aspecto, el método comprende proporcionar una cantidad eficaz de una composición que comprende un ácido nucleico de acuerdo con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87.

La presente descripción proporciona e incluye métodos para reducir la carga de parásitos de un organismo hospedador. En un aspecto, la carga de parásitos se refiere a la cantidad de parásitos por hospedador

individual. En un aspecto, la carga de parásitos se refiere a la cantidad promedio de parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, la carga de parásitos se puede referir a la cantidad de parásitos por colonia de hospedadores parásitos. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, el parásito es *Varroa destructor* y el hospedador es la abeja melífera, *Apis mellifera*. En determinados aspectos, la carga de parásitos se refiere a la cantidad de parásitos *Varroa destructor* por 100 abejas melíferas en una colonia. La presente divulgación proporciona e incluye métodos y composiciones para reducir la carga parasitaria a menos de 6 parásitos *Varroa destructor* por 100 abejas melíferas en una colonia. La presente divulgación también proporciona e incluye métodos y composiciones para reducir la carga parasitaria a menos de 5 parásitos *Varroa destructor* por 100 abejas melíferas en una colonia. La presente divulgación proporciona e incluye métodos y composiciones para reducir la carga parasitaria a menos de 4 parásitos *Varroa destructor* por 100 abejas melíferas en una colonia. La presente divulgación proporciona e incluye métodos y composiciones para reducir la carga parasitaria a menos de 2 parásitos *Varroa destructor* por 100 abejas melíferas en una colonia.

En un aspecto, los métodos para reducir una carga de parásitos comprenden proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida a un organismo hospedador. Una cantidad eficaz de una composición de la presente descripción produce una disminución en la carga de parásitos en un período. En un aspecto, una disminución en la carga de parásitos se puede medir en un plazo de un día del suministro de una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico. En un aspecto, la carga de parásitos se puede medir después de dos días. En un aspecto, la carga de parásitos se puede medir después de 3 días. En otros aspectos, la carga de parásitos se puede medir después de 5 días o después de 1 semana. En otro aspecto, la carga de parásitos se puede medir más de una vez, por ejemplo, cada 3 días, cada 5 días, todas las semanas o una vez al mes. En determinados aspectos de acuerdo con la presente descripción, una disminución de la cantidad de parásitos se puede medir y comparar con un organismo o colonia de control no tratados. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, el parásito es *Varroa destructor* y el hospedador es la abeja melífera, *Apis mellifera*.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una reducción de la carga de parásitos después de un período significa una disminución de la cantidad de parásitos. En un aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 10 %, el 20 %, el 30 % o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 40 % o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 50% o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 60% o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 70% o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 80% o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 90% o más entre las mediciones.

En otros aspectos, la carga de parásitos se puede medir como la cantidad promedio de parásitos por organismo hospedador. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 20 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 15 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 10 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 5 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 4 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 3 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 2 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 1 parásito por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 20 parásitos por 1000 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 15 parásitos por 1000 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 10 parásitos por 1000 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 5 parásitos por 1000 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 4 parásitos por 1000 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 3 parásitos por 1000 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 2 parásitos por 1000 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos disminuida puede comprender menos de 1 parásito por 1000 organismos hospedadores.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una colonia de organismos hospedadores tiene una carga de parásitos inicial, antes de recibir una fuente de una cantidad eficaz de un ácido nucleico. En un aspecto, una carga de parásitos inicial puede comprender menos de 20 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos inicial puede comprender menos de 15 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos inicial puede comprender menos de 10 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos inicial puede comprender menos de 5 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos inicial puede comprender menos de 4 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos inicial puede comprender menos de 3 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga

de parásitos inicial puede comprender menos de 2 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una carga de parásitos inicial puede comprender menos de 1 parásitos por 100 organismos hospedadores.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una cantidad eficaz se puede proporcionar de forma periódica o continua. En un aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida una, dos o tres veces por día. En otros aspectos, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida una vez por día. En otro aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida una o más veces cada dos días. En un aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida cada dos días, cada tres días o una vez por semana. En un aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida cada dos semanas. En un aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida cada tres semanas. En un aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida una vez por mes. En un aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida cada dos meses. En un aspecto, una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico se puede proporcionar de forma continua a un organismo que lo necesite, por ejemplo, proporcionando una fuente continua de alimento. En un aspecto, una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico se puede proporcionar de forma continua como una composición ingerible por abejas. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, el parásito es *Varroa destructor* y el hospedador es la abeja melífera, *Apis mellifera*. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida puede ser un ARNbc.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, la carga parasitaria puede disminuir en un período. En un aspecto, el período necesario para que una carga parasitaria disminuya puede ser 15 semanas. En otro aspecto, el período para que una carga parasitaria disminuya puede ser 12 semanas. En un aspecto, la disminución de la carga parasitaria se produce en un período de 10 semanas. En un aspecto, el período necesario para que una carga parasitaria disminuya puede ser 5 semanas. En otro aspecto, el período para que una carga parasitaria disminuya puede ser 2 semanas. En un aspecto, la disminución de la carga parasitaria se produce en un período de 1 semana. En algunos aspectos, la carga parasitaria puede disminuir después de un día, dos días o tres días.

La presente descripción proporciona métodos para reducir la parasitación de una colonia de abejas melíferas que comprenden proporcionar a una colonia de abejas una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida. Una cantidad eficaz de una composición de la presente descripción produce una reducción de la parasitación en un período. En un aspecto, una reducción de la parasitación se puede medir en un plazo de un día del suministro de una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida. En un aspecto, la reducción de la parasitación se puede medir después de dos días. En un aspecto, la reducción de la parasitación se puede medir después de 3 días. En otros aspectos, la reducción de la parasitación se puede medir después de 5 días o después de 1 semana. En otro aspecto, la reducción de la parasitación se puede medir más de una vez, por ejemplo, cada 3 días, cada 5 días, todas las semanas o una vez al mes. En determinados aspectos de acuerdo con la presente descripción, una reducción de la parasitación se puede medir y comparar con un organismo o colonia de control no tratados.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una reducción de la parasitación después de un período significa una disminución de la cantidad total de parásitos. En un aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 10 %, el 20 %, el 30 % o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 40 % o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 50% o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 60% o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 70% o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 80% o más entre las mediciones. En otro aspecto, la cantidad de parásitos puede disminuir en el 90% o más entre las mediciones.

En otros aspectos, la reducción de la parasitación se puede medir como la cantidad promedio de parásitos por organismo hospedador. En un aspecto, una reducción de la parasitación puede comprender menos de 20 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una reducción de la parasitación puede comprender menos de 15 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una reducción de la parasitación puede comprender menos de 10 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una reducción de la parasitación puede comprender menos de 5 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una reducción de la parasitación puede comprender menos de 4 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una reducción de la parasitación puede comprender menos de 3 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una reducción de la parasitación puede comprender menos de 2 parásitos por 100 organismos hospedadores. En un aspecto, una reducción de la parasitación puede comprender menos de 1 parásitos por 100 organismos hospedadores.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, se puede proporcionar una cantidad eficaz de ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida que produce una reducción de la parasitación de forma periódica o continua. En un aspecto, una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico se puede proporcionar una, dos o tres veces por día. En otros aspectos, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida una vez por día. En otro aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida una o más veces cada dos días. En un aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida cada dos días, cada tres días o una vez por semana. En un aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida de forma continua a un organismo que lo necesite, por ejemplo, proporcionando una fuente continua de alimento. En un aspecto, se puede proporcionar una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida de forma continua como una composición ingerible por abejas. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, el parásito es *Varroa destructor* y el hospedador es la abeja melífera, *Apis mellifera*. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida puede ser un ARNbc.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, la reducción de la parasitación puede disminuir en un período. En un aspecto, el período necesario para una reducción de la parasitación puede ser 15 semanas. En otro aspecto, el período para una reducción de la parasitación puede ser 12 semanas. En un aspecto, la reducción de la parasitación se produce en un período de 10 semanas. En un aspecto, el período necesario para una reducción de la parasitación puede ser 5 semanas. En otro aspecto, el período para una reducción de la parasitación puede ser 2 semanas. En un aspecto, la reducción de la parasitación se produce en un período de 1 semanas. En algunos aspectos, la reducción de la parasitación se puede producir después de un día, dos días o tres días.

En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, una reducción de la parasitación se mide mediante la cantidad de parásitos supervivientes en comparación con una medición inicial de la cantidad de parásitos en una colonia de organismos hospedadores. En un aspecto, el parásito puede ser un ácaro *Varroa destructor* y el hospedador puede ser una abeja melífera, *Apis mellifera*. En un aspecto, la cantidad de parásitos supervivientes puede ser el 25 % de la cantidad inicial de parásitos. En un aspecto, la cantidad de parásitos supervivientes puede ser el 15% de la cantidad inicial de parásitos. En un aspecto, la cantidad de parásitos supervivientes puede ser el 10% de la cantidad inicial de parásitos. En un aspecto, la cantidad de parásitos supervivientes puede ser el 5% de la cantidad inicial de parásitos. En un aspecto, la cantidad de parásitos supervivientes puede ser menos del 5 % o incluso no detectable después de proporcionarle a una colonia hospedadora una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico antiparasitaria, antiplaga o insecticida.

En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos y composiciones para reducir la susceptibilidad de las abejas a la infestación del ácaro *Varroa*. En otros aspectos, la presente descripción proporciona métodos y composiciones para evitar la infestación de las colonias de abejas. En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos y composiciones para reducir la parasitación de las abejas melíferas por el ácaro *Varroa destructor*.

De acuerdo con la presente descripción, un organismo hospedador que recibe una fuente de ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida, puede acumular ácido nucleico en el cuerpo del hospedador, generalmente la hemolinfa. Al albergar al ácido nucleico, dichos organismos hospedadores se vuelven resistentes o menos susceptibles a la parasitación. En otros aspectos, una colonia de organismos hospedadores, a la que se le proporciona una fuente de ácido nucleico, puede acumular ácido nucleico en el cuerpo hospedador de múltiples miembros de la colonia, mediante lo cual se proporciona resistencia o menor susceptibilidad a un parásito. Se puede detectar el ácido nucleico que se encuentra en los organismos hospedadores que reciben una fuente de ácido nucleico utilizando los métodos conocidos por los entendidos en la técnica. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida puede ser un ARNbc.

En un aspecto de la presente descripción, se proporcionan métodos y composiciones para tratar las infestaciones con el ácaro *Varroa* en las abejas mediante la regulación por disminución de la calmodulina y los productos génicos del ácaro *Varroa* relacionados con la calmodulina. En un aspecto, las composiciones comprenden un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, las composiciones comprenden un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, las composiciones comprenden un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 69. En un aspecto, las composiciones comprenden un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 70. En algunos aspectos, las composiciones comprenden un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida que corresponde a una secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En otro aspecto, las composiciones comprenden un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida que corresponde a una secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* seleccionada de SEQ ID NO: 3, 4, 88 y 89. En un aspecto, las

composiciones comprenden un ARN pequeño que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARN pequeño que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARN pequeño que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 69. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARN pequeño que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 70. En algunos aspectos, las composiciones comprenden un ARN pequeño que corresponde a una secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En otro aspecto, las composiciones comprenden un ARN pequeño que corresponde a una secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* seleccionada de SEQ ID NO: 3, 4, 88 y 89. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARNbc que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARNbc que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARNbc que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 69. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARNbc que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 70. En algunos aspectos, las composiciones comprenden un ARNbc que corresponde a una secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En otro aspecto, las composiciones comprenden un ARNbc que corresponde a una secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* seleccionada de SEQ ID NO: 3, 4, 88 y 89. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARNip que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 1. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARNip que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARNip que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 69. En un aspecto, las composiciones comprenden un ARNip que corresponde a la secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* de SEQ ID NO: 70. En algunos aspectos, las composiciones comprenden un ARNip que corresponde a una secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* seleccionada de SEQ ID NO: 71-87. En otro aspecto, las composiciones comprenden un ARNip que corresponde a una secuencia de calmodulina de *Varroa destructor* seleccionada de SEQ ID NO: 3, 4, 88 y 89. En algunos aspectos de acuerdo con la presente descripción, la composición puede comprender un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida que corresponde a una región de SEQ ID NO: 1 o 2. En otros aspectos de acuerdo con la presente descripción, la composición puede comprender un ácido nucleico antiparasitario, antiplaga o insecticida que corresponde a una región de SEQ ID NO: 69 o 70. En otros aspectos de acuerdo con la presente descripción, la composición puede comprender un ácido nucleico que corresponde a una región de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 3, 4, 88 y 89.

Los ácaros *Varroa* parasitan a las pupas y a las abejas adultas y se reproducen en las celdas de cría de las pupas. Los ácaros utilizan la boca para perforar el exoesqueleto y alimentarse de la hemolinfa de las abejas. Los presentes inventores descubrieron inesperadamente que los agentes de polinucleótidos administrados a las abejas para tratar las infestaciones con el ácaro *Varroa* se presentaron en la hemolinfa de las abejas mediante lo cual quedaron disponibles para el ácaro.

Los presentes inventores han demostrado que los fragmentos de ARNbc dirigidos a la calmodulina se pueden transferir con éxito a los ácaros *Varroa* (véase, p. ej., la figura 2), que el ARNbc puede servir para regular por disminución la expresión de los genes de calmodulina en el ácaro *Varroa* (véase, p. ej., la figura 3A) y, además, que la focalización de los genes de calmodulina para la regulación por disminución puede producir una reducción de la cantidad de ácaros *Varroa* (véase, p. ej., la figura 3B).

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para evitar o tratar una infestación de una abeja con el ácaro *Varroa destructor*, el método comprende la administración a la abeja de una cantidad eficaz de un agente de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que regula por disminución la expresión de un gen de calmodulina de un ácaro *Varroa destructor*, evitando o tratando así una infestación de una abeja con el ácaro *Varroa destructor*.

De acuerdo con este aspecto de la presente descripción, los agentes de la presente descripción se utilizan para evitar que el ácaro *Varroa destructor* viva como un parásito en la abeja o en sus larvas. La expresión "ácaro *Varroa destructor*" se refiere al ácaro parasitario externo que ataca las abejas melíferas *Apis cerana* y *Apis mellifera*. El ácaro se puede encontrar en una etapa adulta, alimentándose de la abeja, o en una etapa de larva, dentro de la celda de cría de la abeja melífera.

Como se mencionó, los agentes de la presente descripción son capaces de regular por disminución selectivamente la expresión de un producto génico de un ácaro *Varroa destructor*. Según se utiliza aquí, la expresión "producto génico" se refiere a una molécula de ARN o a una proteína. De acuerdo con un aspecto, el producto génico del ácaro *Varroa destructor* es un producto que es esencial para la viabilidad de los ácaros. La regulación por disminución de dicho producto génico provocaría típicamente la muerte del ácaro *Varroa*. De acuerdo con otro aspecto, el producto génico del ácaro *Varroa destructor* es un producto que es esencial para la reproducción de los ácaros. La regulación por disminución de dicho producto génico provocaría típicamente el impedimento de la reproducción del ácaro *Varroa* y la exterminación eventual de la población de ácaros. De acuerdo con otro aspecto, el producto génico del ácaro *Varroa destructor* es un producto que es necesario para generar síntomas patogénicos en la abeja. En algunos aspectos, el producto génico de *Varroa destructor* es

un gen de calmodulina. En determinados aspectos, el gen de calmodulina puede comprender una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En determinados aspectos, el gen de calmodulina puede comprender una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 70.

- 5 Algunos ejemplos de productos génicos que se pueden regular por disminución de acuerdo con este aspecto de la presente descripción incluyen, entre otros, un gen de calmodulina.

En un aspecto de acuerdo con la presente descripción, los agentes capaces de regular por disminución la expresión de un producto génico de un ácaro *Varroa destructor* u otro parásito, pueden regular por disminución en una menor medida la expresión del producto génico en otros animales, como la abeja u otro organismo no diana. En consecuencia, determinados agentes de la presente descripción son capaces de distinguir entre el gen del ácaro y el gen de la abeja, regular por disminución el primero en mayor medida que el último. En algunos aspectos, determinados agentes de la presente descripción pueden distinguir entre el gen diana en el organismo diana y los ortólogos en los organismos no diana, regular por disminución los primeros en mayor medida que los últimos. En otros aspectos, el gen diana del parásito se regula por disminución, mientras que el gen hospedador homólogo no. En otro aspecto, el gen diana del parásito no tiene un homólogo en el hospedador. De acuerdo con otro aspecto, los agentes de la presente descripción no regulan por disminución en absoluto el gen de la abeja. Por ejemplo, esto se puede llevar a cabo focalizando un gen que se expresa de forma diferencial en el ácaro y no en la abeja, p. ej., el gen del canal de sodio del ácaro - FJ216963. Alternativamente, los agentes de la presente descripción se pueden dirigir a secuencias específicas de los ácaros de un gen que se expresa en el ácaro y en la abeja.

De acuerdo con un aspecto, los agentes de la presente descripción se dirigen a segmentos de genes *Varroa* que tienen al menos 100 bases de longitud y que no portan ninguna secuencia de más de 19 bases que sea enteramente homóloga a ninguna secuencia del genoma de la abeja o secuencia del genoma humano. Aunque se apreciará que se puede focalizar más de un gen para maximizar el efecto citotóxico sobre los ácaros *Varroa*, las composiciones que comprenden uno o algunos ARN pequeños aumentarían la probabilidad de ser una composición insecticida selectiva ya que la reactividad cruzada con otros insectos se puede reducir.

De acuerdo con un aspecto, se puede preparar una composición de ARNbc que corresponda a los genes de Calmodulina-1 y Calmodulina-2 de *Varroa destructor* (p. ej., utilizando agentes de ácido nucleico que tengan la secuencia según se presenta en SEQ ID NO: 1 a 4 y 69 a 89, sus complementos o ácidos nucleicos dirigidos a sus regiones).

Se apreciará que además de regular por disminución una cantidad de genes, la presente descripción además proporciona e incluye el uso de varios agentes para regular por disminución al mismo gen (p. ej., varios ácidos nucleicos o ARNbc, cada uno de los cuales se hibrida con un segmento diferente del mismo gen). Por ejemplo, en un aspecto, se puede utilizar una combinación de uno o más ácidos nucleicos correspondientes a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 4, 6, 23, 26 a 35 y 69 a 89 para aumentar la citotoxicidad y los efectos antiparasitarios de la composición. Se pueden utilizar herramientas capaces de identificar las secuencias específicas de las especies para este propósito, p. ej., BLASTN y otros programas informáticos similares. Las publicaciones de patentes estadounidenses N.º 20090118214 y 20120108497 proporcionan el uso de ARNbc para prevenir y tratar las infecciones virales en las abejas melíferas. La publicación de patente estadounidense N.º 20120258646 proporciona el uso de ARNbc para controlar al *Varroa destructor* en las abejas melíferas.

La presente descripción proporciona e incluye composiciones y métodos para regular por disminución la expresión de un gen en un organismo diana. En un aspecto, el organismo diana puede ser un parásito. En determinados aspectos, el parásito puede ser *Varroa destructor*. Según se emplea aquí, el término "expresión regulada por disminución" se refiere a provocar, directa o indirectamente, una reducción en la transcripción de un gen deseado, una reducción en la cantidad, estabilidad o traducibilidad de los productos de transcripción (p. ej., ARN) del gen y/o reducción en la traducción del polipéptido codificado por el gen deseado. La regulación por disminución de la expresión de un producto génico de un ácaro *Varroa destructor* se puede monitorizar, por ejemplo, mediante detección directa de las transcripciones génicas (por ejemplo, por PCR), por detección de los polipéptidos codificados por el gen o el ARN del patógeno de la abeja (por ejemplo, por análisis de transferencia Western o inmunoprecipitación), por detección de la actividad biológica de los polipéptidos codificados por el gen (por ejemplo, actividad catalítica, unión al ligando y similares) o mediante monitorización de los cambios en el ácaro *Varroa destructor* (por ejemplo, proliferación reducida del ácaro, virulencia reducida del ácaro, motilidad reducida del ácaro, etc.) y mediante la evaluación de la infectividad/patogenicidad de las abejas.

La regulación por disminución de un producto génico de un parásito o plaga se puede realizar sobre el nivel genómico y/o de transcripción utilizando diversos agentes que interfieren con la transcripción y/o traducción (p. ej., agentes de silenciamiento de ARN, ribozima, ADNzima y moléculas de ácido nucleico antisentido). La regulación por disminución de un producto génico de un ácaro *Varroa destructor* se puede realizar sobre el nivel genómico y/o de transcripción utilizando diversos agentes que interfieren con la transcripción y/o

traducción (p. ej., agentes de silenciamiento de ARN, ribozima, ADNzima y moléculas de ácido nucleico antisentido).

De acuerdo con un aspecto, el agente que regula por disminución la expresión de un producto génico de un parásito o plaga es un ARN pequeño, como un agente de silenciamiento de ARN. De acuerdo con el presente aspecto, el ARN pequeño tiene una longitud mayor que 15 pares de bases. En otro aspecto, el ARN pequeño tiene una longitud mayor que 50 pares de bases. En un aspecto, el ARN pequeño tiene una longitud mayor que 50 pares de bases, pero menor que aproximadamente 500 pares de bases. En un aspecto, el ARN pequeño tiene una longitud mayor que 100 pares de bases, pero menor que aproximadamente 500 pares de bases. En un aspecto, el ARN pequeño tiene una longitud mayor que 200 pares de bases, pero menor que aproximadamente 500 pares de bases. En un aspecto, la plaga o el parásito puede ser un ácaro *Varroa destructor*.

Otro método para regular por disminución un producto génico de una plaga o parásito es mediante la introducción de ARN inhibidores pequeños (ARNip). Otro método para regular por disminución un producto génico del ácaro *Varroa* es mediante la introducción de ARN inhibidores pequeños (ARNip).

En un aspecto de la presente descripción, la síntesis de los agentes de silenciamiento de ARN adecuada para utilizar con la presente descripción se puede realizar del siguiente modo. Primero, se escanea el ARNm diana del parásito o plaga por debajo del codón de inicio AUG para las secuencias de dinucleótidos AA. Se registra la aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes 3' se registran como posibles sitios diana de ARNip. Preferentemente, los sitios diana de ARNip se seleccionan del marco de lectura abierto, ya que las regiones no traducidas (UTR) son más ricas en sitios de unión a la proteína reguladora. Las proteínas de unión a UTR y/o los complejos de inicio de traducción pueden interferir con la unión del complejo de endonucleasa de ARNip (Tuschl ChemBiochem. 2:239-245). Sin embargo, se apreciará que los ARNip dirigidos a las regiones no traducidas también pueden ser eficaces, según se demostró para GAPDH, en donde el ARNip dirigido a 5' UTR medio aproximadamente el 90 % de la disminución en el ARNm de GAPDH celular y suprimió completamente el nivel de proteína (disponible en Internet en www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html).

En segundo lugar, se comparan los posibles sitios diana con una base de datos genómica adecuada (p. ej., humana, de abejas, de mariposa monarca, de ratón, de rata, etc.) utilizando cualquier software de alineación de secuencia, como el software BLAST disponible del servidor NCBI (disponible en Internet en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se filtran los sitios diana putativos que presentan una homología significativa con otras secuencias codificantes.

Se seleccionan las secuencias diana que califican como un molde para la síntesis de ARNip. Las secuencias preferidas son las que incluyen un bajo contenido de G/C, ya que se ha demostrado que son más eficaces en la mediación del silenciamiento génico en comparación con las de contenido de G/C mayor al 55 %. Se seleccionan preferentemente varios sitios diana a lo largo de la longitud del gen diana o de la secuencia para la evaluación. Para una mejor evaluación de los ARNip seleccionados, preferentemente, se utiliza un control negativo en conjunto. El ARNip de control negativo preferentemente incluye la misma composición de nucleótidos que los ARNip, pero carece de homología significativa con el genoma. Por lo tanto, se utiliza preferentemente una secuencia de nucleótidos desalineada del ARNip, siempre que no presente ninguna homología significativa con ningún otro gen o secuencia diana del parásito o plaga. Se proporciona un ejemplo de una secuencia de nucleótidos desalineada en la SEQ ID NO. 5.

Por ejemplo, un ARNip que se puede utilizar en este aspecto de la presente descripción es uno que se dirige a un gen de calmodulina específico del ácaro. Se proporcionan ejemplos de ARNip en las SEQ ID NO: 3, 4, 88 y 89.

Se apreciará que el agente de silenciamiento de ARN de la presente descripción no debe limitarse a las moléculas que contienen solo ARN, sino que también comprende los nucleótidos y no nucleótidos químicamente modificados.

En algunos aspectos, el agente de silenciamiento de ARN proporcionado aquí puede estar asociado funcionalmente con un péptido que penetra en la célula. Según se emplea aquí, un "péptido que penetra en la célula" es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos corta (aproximadamente 12 residuos) o un motivo funcional que confiere las propiedades de traslocación independientes de la energía (es decir, no endocitóticas) asociadas con el transporte del complejo permeable a la membrana en el plasma y/o las membranas nucleares de una célula. El péptido que penetra en la célula utilizado en el complejo permeable a la membrana de la presente descripción comprende preferentemente al menos un residuo de cisteína no funcional, que es libre o se deriva para formar un enlace disulfuro con un ácido ribonucleico de cadena doble que se ha modificado para dicha unión. Se enumeran motivos de aminoácidos representativos que confieren dichas propiedades en la patente estadounidense N.º 6.348.185. Los péptidos que penetran en las células de la presente descripción incluyen preferentemente, entre otros, penetratina, transportano, plsl, TAT(48-60), pVEC, MTS y MAP.

Otro agente capaz de regular por disminución un producto génico de una plaga o parásito es una molécula de ADNzima capaz de escindir específicamente una transcripción de ARNm o secuencia de ADN del polipéptido del patógeno de la abeja. Las ADNzimas son polinucleótidos de cadena simple capaces de escindir secuencias diana simples y dobles (Breaker, R.R. y Joyce, G. Chemistry and Biology 1995;2:655; Santoro, S.W. y Joyce, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997;94:4262). Se ha propuesto un modelo general (el modelo "10-23") para la ADNzima. Las ADNzimas "10-23" tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, flanqueados por dos dominios de reconocimiento de sustratos de siete a nueve desoxirribonucleótidos cada uno. Este tipo de ADNzima puede escindir eficazmente su ARN de sustrato en las uniones de purina:pirimidina (Santoro, S.W. y Joyce, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; para una revisión de las ADNzimas, véase Khachigian, LM, Curr Opin Mol Ther 4:119-21 (2002)). En un aspecto, el producto génico del parásito o plaga puede ser un producto génico del ácaro *Varroa*. La regulación por disminución de los productos génicos de una plaga o parásito también se puede realizar mediante el uso de un polinucleótido antisentido capaz de hibridarse específicamente con una transcripción de ARNm que codifique el producto génico de la plaga o parásito. El diseño de las moléculas antisentido que se puede utilizar para regular por disminución eficazmente un producto génico de una plaga o parásito se debe realizar considerando dos aspectos importantes para el enfoque antisentido. El primer aspecto es la administración del oligonucleótido en el citoplasma de las células adecuadas, mientras que el segundo aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se una específicamente a la secuencia diana de ARN o al ARNm designado dentro de las células de un modo que inhiba su traducción. En un aspecto, el producto génico del parásito o plaga puede ser un producto génico del ácaro *Varroa*. En otro aspecto, el producto génico del parásito o plaga puede ser un producto génico de calmodulina.

Existen múltiples estrategias de administración que se pueden utilizar para administrar de manera eficiente oligonucleótidos en diversos tipos de células (véase, por ejemplo, Luft J Mol Med 76: 75-6 (1998); Kronenwett et al. Blood 91: 852-62 (1998); Rajur et al. Bioconjug Chem 8: 935-40 (1997); Lavigne et al. Biochem Biophys Res Commun 237: 566-71 (1997) y Aoki et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun 231: 540-5 (1997)).

Además, también existen algoritmos para identificar las secuencias con la mayor afinidad de unión prevista para su ARNm diana basándose en un ciclo termodinámico que representa la energía de las modificaciones estructurales en el ARNm diana y el oligonucleótido (véase, por ejemplo, Walton et al. Biotechnol Bioeng 65: 1-9 (1999)). Dichos algoritmos se han utilizado con éxito para implementar un enfoque antisentido en las células. Por ejemplo, el algoritmo desarrollado por Walton et al. les permitió a los científicos el diseño exitoso de oligonucleótidos antisentido para las transcripciones de betaglobina de conejo (RBG) y del factor alfa de necrosis tumoral de ratón (TNF alfa). Más recientemente, el mismo grupo de investigación informó que las actividades antisentido de los oligonucleótidos seleccionados racionalmente contra tres ARNm diana modelo (lactato deshidrogenasa humana A y B y gp1 de rata) en cultivo celular según lo evaluado por una técnica de PCR cinética resultaron eficaces en la mayoría de los casos, incluidas las pruebas contra tres dianas diferentes en dos tipos celulares con químicas de fosfodiéster y oligonucleótidos de fosforotioato. Además, también se publicaron diversos enfoques para diseñar y predecir la eficiencia de los oligonucleótidos específicos utilizando un sistema *in vitro* (Matveeva et al., Nature Biotechnology 16: 1374 - 1375 (1998)).

Otro agente capaz de regular por disminución un producto génico de una plaga o parásito es una molécula de ribozima capaz de escindir específicamente una transcripción de ARNm codificante del producto génico del ácaro *Varroa*. Las ribozimas se están utilizando cada vez más para la inhibición específica de la secuencia de la expresión génica mediante la escisión de los ARNm codificantes de proteínas de interés (Welch et al., Curr Opin Biotechnol. 9:486-96 (1998)). La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier ARN diana específico, incluido el ARN viral, las convierte en herramientas valiosas en la investigación básica y en las aplicaciones terapéuticas. En un aspecto, el producto génico del parásito o plaga puede ser un producto génico del ácaro *Varroa*. En otro aspecto, el producto génico del parásito o plaga puede ser un producto génico de calmodulina.

Un método adicional para regular por disminución la expresión de un producto génico de una plaga o parásito en las células es a través de oligonucleótidos formadores de tríplex (TFO). Estudios recientes han demostrado que se pueden diseñar TFO que pueden reconocer y unirse a regiones de polipurina/polipirimidina en el ADN helicoidal de cadena doble de una manera específica de la secuencia. Estas reglas de reconocimiento se describen en Maher III, L. J., et al., Science (1989) 245:725-7; Moser, H. E., et al., Science, (1987) 238:645-6; Beal, P. A., et al., Science (1992) 251:1360-1363; Cooney, M., et al., Science (1988) 241:456-459; y Hogan, M. E., et al., publicación de EP 375408. La modificación de los oligonucleótidos, así como la introducción de intercaladores y sustituciones en la cadena principal, y la optimización de las condiciones de unión (pH y concentración de cationes) han ayudado a superar los obstáculos inherentes a la actividad de TFO como la repulsión de carga y la inestabilidad, y se demostró recientemente que los oligonucleótidos sintéticos se pueden dirigir a secuencias específicas (para observar una revisión reciente véase Seidman y Glazer, J Clin Invest 2003;112:487-94). En un aspecto, el producto génico del parásito o plaga puede ser un producto génico del ácaro *Varroa*. En otro aspecto, el producto génico del parásito o plaga puede ser un producto génico de calmodulina.

En general, el oligonucleótido formador de tríplex tiene la correspondencia de secuencia:

oligo	3'—A	G	G	T
dúplex	5'—A	G	C	T
dúplex	3'—T	C	G	A

Sin embargo, se ha demostrado que los tripletes A-AT y G-GC tienen la mayor estabilidad helicoidal triple (Reither y Jeltsch, BMC Biochem, 2002, sept. 12, Epub). Los mismos autores han demostrado que los TFO diseñados de acuerdo con la regla A-AT y G-GC no forman tríplex no específicos, lo que indica que la formación de tríplex es, de hecho, específica de la secuencia.

Los oligonucleótidos formadores de tríplex preferentemente tienen al menos 15, más preferentemente 25, más preferentemente o más nucleótidos de longitud hasta 50 o 100 bp.

La transfección de células (por ejemplo, a través de liposomas catiónicos) con TFO y la formación de la estructura helicoidal triple con el ADN diana induce cambios estéricos y funcionales, bloquea el inicio de la transcripción y el alargamiento, lo que permite la introducción de los cambios en la secuencia deseados en el ADN endógeno y lo que produce la regulación por disminución específica de la expresión génica.

Se puede obtener una descripción detallada del diseño, la síntesis y la administración de TFO eficaces en las publicaciones de patentes estadounidenses N.º 2003/017068 y 2003/0096980 de Froehler et al., y 2002/0128218 y 2002/0123476 de Emanuele et al., y la patente estadounidense N.º 5.721.138 de Lawn.

Los agentes de regulación por disminución de los polinucleótidos de la presente descripción se pueden generar de acuerdo con cualquier método de síntesis de polinucleótidos conocido en la técnica, como la síntesis enzimática o la síntesis de fase sólida. Los equipos y los reactivos para ejecutar la síntesis de fase sólida son comercializados, por ejemplo, por Applied Biosystems. También se puede utilizar cualquier otro método para dicha síntesis; la síntesis real de los polinucleótidos se encuentra dentro de las capacidades de los entendidos en la técnica y se puede lograr a través de las metodologías establecidas según lo descrito, por ejemplo, en "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988) y "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984) utilizando química de fase sólida, p. ej., cianoetil fosforamida seguida de la desprotección, desalado y purificación, por ejemplo, por un método automático sobre tritilo o HPLC.

Los agentes de polinucleótidos de la presente descripción pueden comprender nucleósidos heterocíclicos que consisten en purinas y las bases de pirimidinas, unidos en una unión de fosfodiéster de 3' a 5'. Los agentes de polinucleótidos utilizados preferentemente son aquellos modificados ya sea en la estructura principal, en las uniones internucleósidos o las bases, según se describe ampliamente en virtud del presente.

Algunos ejemplos específicos de los agentes de polinucleótidos útiles de acuerdo con este aspecto de la presente descripción incluyen los agentes de polinucleótidos que contienen estructuras principales modificadas o uniones internucleósidos no naturales. Los agentes de polinucleótidos que tienen estructuras principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la estructura principal, según lo descrito en las patentes estadounidenses N.º: 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361 y 5.625.050.

Las estructuras principales de polinucleótidos modificadas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, fosfotriésteres de aminoalquilo, fosfonatos de metilo y otros alquil fosfonatos incluido 3'-alquilo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluido 3'- amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos unidos en 2'-5' de estos y aquellos que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidas en 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se pueden utilizar diversas sales, sales mezcladas y formas de ácidos libres.

Alternativamente, estructuras modificadas de polinucleótidos que no incluyen un átomo de fósforo en ellas tienen estructuras formadas por enlaces internucleósidos alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos alquilo o cicloalquilo mixtos de heteroátomo o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces de morfolina (formados en parte por la parte de azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxano; estructuras de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras de formaceto y tioformaceto; estructuras de metileno formaceto y tioformaceto; estructuras que convienen alqueno; estructuras de sulfamato; estructuras de ácido metilenimino y metilenhidracina; estructuras de sulfonato y sulfonamida; estructuras de amida; y otras que tienen mezclas con partes de los componentes N, O, S y CH₂, según se describe en las patentes estadounidenses N.º:

5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.214.134; 5.466.677; 5.610.289; 5.633.360; 5.677.437 y 5.677.439.

- Otros agentes de polinucleótidos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción, son aquellos modificados en la unión de internucleósidos y de azúcar, es decir, la estructura principal de las unidades de nucleótidos se reemplazan por grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para la complementación con la diana de polinucleótidos adecuada. Un ejemplo para dicho polinucleótido mimético, incluye el ácido nucleico péptido (PNA). Un polinucleótido PNA se refiere a un polinucleótido en donde la cadena principal de azúcar se reemplaza con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las bases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida de la cadena principal. Las patentes estadounidenses que describen la preparación de compuestos de PNA incluyen, entre otras, las patentes estadounidenses N.º 5.539.082; 5.714.331 y 5.719.262. Otras modificaciones de la cadena principal, que se pueden utilizar en la presente descripción se describen en la patente estadounidense N.º 6.303.374.
- Los agentes de polinucleótidos de la presente descripción también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases. Según se emplea aquí, las bases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases modificadas incluyen, entre otras, otras bases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracila y citosina, 5-propinilo uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Las bases adicionales incluyen las descritas en la patente estadounidense N.º 3.687.808, las descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, edición internacional, 1991, 613, y las descritas por Sanghvi, Y. S., capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-2, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Estas bases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la descripción. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y O-6 purinas sustituidas, incluido 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad en dúplex del ácido nucleico por 0,6-1,2 °C (Sanghvi YS et al., (1993), Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton 276-278) y son sustituciones de bases preferidas en la actualidad, incluso más específicamente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Después de la síntesis, se pueden purificar opcionalmente los agentes de polinucleótidos de la presente descripción. Por ejemplo, se pueden purificar los polinucleótidos a partir de una mezcla mediante la extracción con un disolvente o resina, la precipitación, la electroforesis, la cromatografía o una combinación de estas. Alternativamente, se pueden utilizar los polinucleótidos sin purificación, o con una purificación mínima, para evitar las pérdidas debido al procesamiento de las muestras. Los polinucleótidos se pueden secar para el almacenamiento o se pueden disolver en una solución acuosa. La solución puede contener amortiguadores o sales para promover la hibridación y/o la estabilización de las cadenas de los dúplex.

Se apreciará que un agente de polinucleótido de la presente descripción se puede proporcionar *per se*, o como una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el agente de polinucleótidos. Típicamente, la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia promotora que es funcional en la célula hospedadora, según se detalla continuación.

Las secuencias de polinucleótidos de la presente descripción, bajo el control de una secuencia promotora unida operativamente, pueden estar flanqueadas por secuencias adicionales que afectan ventajosamente su transcripción t/o la estabilidad de una transcripción resultante. Dichas secuencias, generalmente, se ubican por encima del promotor y/o por debajo del extremo 3' de la construcción de expresión.

El término "unido operativamente", según se utiliza con referencia a una secuencia reguladora y una secuencia de nucleótidos estructural, significa que la secuencia reguladora provoca la expresión regulada de la secuencia de nucleótidos estructural unida. Las "secuencias reguladoras" o los "elementos de control" se refieren a las secuencias de nucleótidos ubicadas por encima, dentro o por debajo de una secuencia de nucleótidos estructural, y que afecta el tiempo y el nivel o la cantidad de transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN o traducción de la secuencia de nucleótidos estructural asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líderes de traducción, intrones, potenciadores, estructuras tallo-bucle, secuencias de unión represoras, secuencias de terminación, secuencias de pausa, secuencias de reconocimiento de poliadenilación y similares.

Se apreciará que los agentes de ácido nucleico se pueden administrar a la plaga o parásito de diversas

maneras. De acuerdo con un aspecto, los agentes de ácido nucleico se administran directamente a la plaga o parásito (p. ej., mediante rociado de una colmena infestada de ácaros). Los agentes de ácido nucleico, o las construcciones codificantes de estos pueden ingresar a los cuerpos de los ácaros mediante difusión. En este aspecto, el promotor de la construcción de ácido nucleico es típicamente operativo en las células de los ácaros.

5 En un aspecto, la plaga o el parásito puede ser *Varroa destructor*.

Se apreciará que como muchos parásitos utilizan sus bocas para perforar el exoesqueleto del artrópodo hospedador y se alimentan de la hemolinfa del artrópodo, la presente descripción contempla la administración de los agentes de polinucleótidos de la presente descripción al artrópodo, mediante lo cual se presentan en la hemolinfa del artrópodo y quedan así disponibles para la plaga o parásito. Por lo tanto, de acuerdo con otro

10 aspecto, los agentes de ácido nucleico se administran indirectamente a la plaga o parásito (por ejemplo a un ácaro a través de una abeja hospedadora). En este aspecto, el promotor de la construcción de ácido nucleico es típicamente operativo en las células hospedadoras. En determinados aspectos, la plaga o parásito puede ser *Varroa destructor* y el artrópodo hospedador puede ser una abeja.

De acuerdo con un aspecto, los agentes de ácido nucleico se administran a los hospedadores infestados mediante rociado. Los agentes de ácido nucleico, o las construcciones codificantes de estos pueden ingresar a los cuerpos de los hospedadores mediante difusión. En determinados aspectos, la plaga o parásito puede ser *Varroa destructor* y el artrópodo hospedador puede ser una abeja.

15 De acuerdo con otro aspecto, los agentes de ácido nucleico se administran al hospedador a través de su alimento. Los presentes inventores consideran que después de la ingesta de los agentes de ácido nucleico de la presente descripción, los agentes se pueden presentar, por ejemplo en un artrópodo hospedador en la hemolinfa del hospedador, mediante lo cual queda disponible para el parásito, por ejemplo, un ácaro *Varroa*.

Por lo tanto, los polinucleótidos de la presente descripción se pueden sintetizar *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en una célula bacteriana o de levadura, y se pueden añadir al alimento. Por ejemplo, el ARN de cadena doble se puede sintetizar mediante el añadido de dos promotores opuestos (p. ej., promotores T7) a los extremos de

20 los segmentos de genes, en donde el promotor se coloca inmediatamente 5' al gen y el promotor se coloca inmediatamente 3' al segmento de gen en la orientación opuesta. El ARNbc se puede preparar mediante la transcripción *in vitro* con la polimerasa de ARN de T7.

Se presentan ejemplos de secuencias para sintetizar ácidos nucleicos, incluido ARNbc, de acuerdo con aspectos de la presente descripción en SEQ ID NO: 1 a 4, 6, 23, 26 a 35 y 69 a 89.

25 Se apreciará que algunas plagas o parásitos provocan sitios de heridas en el exoesqueleto de un artrópodo hospedador. Dichos sitios de heridas albergan infecciones bacterianas. Por ejemplo, un sitio de herida de abeja hospedadora puede albergar una bacteria como *Melissococcus pluton*, que provoca la loque europea. Además de los efectos parasitarios, se sabe que los parásitos actúan como vectores para múltiples patógenos y parásitos. Por ejemplo, se sospecha que los ácaros *Varroa* actúan como vectores para numerosos patógenos de las abejas melíferas, incluido el virus de las alas deformadas (DWV), el virus Cachemira de la abeja (KBV), el virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV) y el virus de las celdas reales negras (BQCV) y pueden debilitar los sistemas inmunitarios de sus hospedadores, dejándolos vulnerables a las infecciones.

Se presentan ejemplos de secuencias para sintetizar ácidos nucleicos, incluido ARNbc, de acuerdo con aspectos de la presente descripción en SEQ ID NO: 1 a 4, 6, 23, 26 a 35 y 69 a 89.

30 Se apreciará que algunas plagas o parásitos provocan sitios de heridas en el exoesqueleto de un artrópodo hospedador. Dichos sitios de heridas albergan infecciones bacterianas. Por ejemplo, un sitio de herida de abeja hospedadora puede albergar una bacteria como *Melissococcus pluton*, que provoca la loque europea. Además de los efectos parasitarios, se sabe que los parásitos actúan como vectores para múltiples patógenos y parásitos. Por ejemplo, se sospecha que los ácaros *Varroa* actúan como vectores para numerosos patógenos de las abejas melíferas, incluido el virus de las alas deformadas (DWV), el virus Cachemira de la abeja (KBV), el virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV) y el virus de las celdas reales negras (BQCV) y pueden debilitar los sistemas inmunitarios de sus hospedadores, dejándolos vulnerables a las infecciones.

35 de las abejas melíferas, incluido el virus de las alas deformadas (DWV), el virus Cachemira de la abeja (KBV), el virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV) y el virus de las celdas reales negras (BQCV) y pueden debilitar los sistemas inmunitarios de sus hospedadores, dejándolos vulnerables a las infecciones.

Por lo tanto, al matar a la plaga o parásito (o evitar su reproducción), los agentes antiparasitarios, antiplagas o insecticidas de la presente descripción se pueden emplear para evitar y/o tratar infecciones bacterianas de organismos hospedadores. Por ejemplo, *Melissococcus pluton* e infecciones virales en abejas hospedadoras provocados por los virus anteriores. Como se cree que la infestación del ácaro *Varroa* y las infecciones virales son responsables del problema de colapso de colonias (CCD), los presentes agentes también se pueden utilizar para evitar o reducir la susceptibilidad de una colonia de abejas al CCD.

40 Por lo tanto, al matar a la plaga o parásito (o evitar su reproducción), los agentes antiparasitarios, antiplagas o insecticidas de la presente descripción se pueden emplear para evitar y/o tratar infecciones bacterianas de organismos hospedadores. Por ejemplo, *Melissococcus pluton* e infecciones virales en abejas hospedadoras provocados por los virus anteriores. Como se cree que la infestación del ácaro *Varroa* y las infecciones virales son responsables del problema de colapso de colonias (CCD), los presentes agentes también se pueden utilizar para evitar o reducir la susceptibilidad de una colonia de abejas al CCD.

Se apreciará que además del suministro de agentes de ácido nucleico antiparasitarios, antiplagas o insecticidas para la reducción de la infección e infestación del patógeno de la abeja, la aplicación de una higienización adecuada (por ejemplo, abstenerse de reutilizar colmenas infestadas) puede aumentar la eficacia del tratamiento y la prevención de las infecciones.

45 Se apreciará que además del suministro de agentes de ácido nucleico antiparasitarios, antiplagas o insecticidas para la reducción de la infección e infestación del patógeno de la abeja, la aplicación de una higienización adecuada (por ejemplo, abstenerse de reutilizar colmenas infestadas) puede aumentar la eficacia del tratamiento y la prevención de las infecciones.

La presente descripción también incluye y proporciona células de levadura y bacterias transgénicas y que expresan un insecticida selectivo. En un aspecto, un ácido nucleico que codifica un ARN pequeño, ARNbc, ARNm o una molécula de ácido nucleico diana resistente a ARNm o pequeño utilizado aquí está vinculado operativamente con un promotor y, opcionalmente, con un terminador. En un aspecto de la presente divulgación, se matan las células de levadura y bacterias transgénicas, por ejemplo, mediante la aplicación de calor o presión. En algunas realizaciones, se lisan las células de levadura y bacterias transgénicas antes de proporcionar el insecticida selectivo al organismo diana. En otro aspecto, las células de levadura y bacterias transgénicas no se lisan.

50 La presente descripción también incluye y proporciona células de levadura y bacterias transgénicas y que expresan un insecticida selectivo. En un aspecto, un ácido nucleico que codifica un ARN pequeño, ARNbc, ARNm o una molécula de ácido nucleico diana resistente a ARNm o pequeño utilizado aquí está vinculado operativamente con un promotor y, opcionalmente, con un terminador. En un aspecto de la presente divulgación, se matan las células de levadura y bacterias transgénicas, por ejemplo, mediante la aplicación de calor o presión. En algunas realizaciones, se lisan las células de levadura y bacterias transgénicas antes de proporcionar el insecticida selectivo al organismo diana. En otro aspecto, las células de levadura y bacterias transgénicas no se lisan.

En un aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada en el presente es o codifica un ARN pequeño, o en un aspecto específico un ARNip, que puede modular la expresión de un gen en un organismo diana. En un aspecto, un ácido nucleico exógeno codifica un ARN pequeño que tiene al menos el 80 %, el 85 %, el 88 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 96 %, el 98 % o el 100 % de la secuencia de nucleótidos de un ARN pequeño.

- el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-4 y 6-89. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada aquí es o codifica una molécula de ARNbc. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada aquí es o codifica un ARNmi artificial. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada aquí es o codifica un ARNip. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada aquí es o codifica un precursor de un ARN pequeño. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada aquí es o codifica un precursor de un ARNmi o ARNip. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada aquí es una molécula natural. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada aquí es una molécula sintética.
- En un aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada aquí es o codifica un precursor tallo-bucle de un ARN pequeño o en un aspecto específico un ARNmi que comprende una secuencia que tiene al menos el 80 %, el 85 %, el 88 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-4 y 6-89. Un precursor tallo-bucle utilizado aquí comprende una secuencia que tiene al menos el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 88 %, el 90 %, el 92 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-4 y 6-89.
- En un aspecto, una molécula de ácido nucleico exógena utilizada aquí es ARN desnudo o expresado a partir de una construcción de la expresión de ácido nucleico, cuando está unido operativamente con una secuencia reguladora.
- En un aspecto, una construcción de ADN recombinante o un transgen descrito aquí comprende además un terminador de transcripción.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Secuencias de gen de calmodulina del ácaro *Varroa*

- Se utilizaron los genes de calmodulina (CAM) proporcionados en la tabla 1 (SEQ ID NO: 1 y 2), o sus transcripciones correspondientes, como dianas de composiciones de polinucleótidos que comprenden un polinucleótido con al menos 18 nucleótidos contiguos idénticos o complementarios a dichos genes o transcripciones. Se utilizaron las secuencias de genes proporcionadas en la tabla 1, las secuencias de proteínas codificadas por dichos genes, o las secuencias presentes dentro de dichos genes para obtener genes de calmodulina (CAM) ortólogos de otras especies de plagas y parásitos de artrópodos no enumeradas en la tabla 1. Dichos genes ortólogos y sus transcripciones pueden servir como dianas de los polinucleótidos proporcionados aquí o como una fuente de polinucleótidos antiparasitarios, antiplagas o insecticidas que están diseñados específicamente para tener como diana los genes ortólogos o sus transcripciones.

TABLA 1.

Genes de calmodulina (CAM) diana de *Varroa destructor*

Nombre del gen	SEQ ID	Secuencia de ADN de marco de lectura abierto
CAM-1	1	ATGGCTGATCAGCTAACTGAGGAACAGATCGCCGAGTTCAAAGAGGCGTTTACGCTGTTTGACAAGGACGGAGATGGCACGATCACGACAAAGGAGCTCGGTACGGTAATGCGATCTCTCGGCCAGAACCCCACTGAGGCTGAACTGCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCCGACGGCTCCGGAACGATAGATTTCCCTGAGTTTCTCACAA TGATGGCAAGAAAGATGAAGGACACCGACTCGGAGGAGGAGATCCGAGAGGC GTTCCGCGTATTCGACAAGGATGGCAACGGTTTCATTTCCGCGGCCGAGCTCAGGCACGTTATGACCAACCTTGCGGAGAAGCTTACGGACGAGGAGGTAGATGAG ATGATTCGGGAGGCAGATATTGACGGTGATGGTCAGGTCAACTACGAGGAGTTCTCACCATGATGACGTCCAAGTAA
CAM-2	2	ATGGCGGATCAGCTGACCGAGGAGCAAATCGCCGAATTCAAGGAGGCTTTTCAGCCTGTTTCGATAAAGACGGTGATGGCACAATTACGACCAAGGAAGTAGGGACCGTCATGCGGTCCCTCGGCCAGAACCCCTACTGAGGCTGAGCTTCAAGACATGATCAACGAGGTCGACGCTGACGGTAACGGCACTATTGACTTTCCAGAGTTTCTCACGATGATGGCGCGTAAAATGAAGGACACCGACTCCGAGGAGGAGATCCGGGAAGCTTTAGGGTTTTTGATAAAGACGGAAATGGCTTCATTTCCGCTGCAGAGCTGAGGCACGTAATGACCAACCTTGCGGAAAAGCTCACGGACGAGGAAGTGACGAGATGATCCGCGAGGCGGATATCGACGGCGACGGACAGGTCAACTACGAGGAGTTTCGT CACGATGATGACATCAAAATGA

Para cada secuencia de genes de ADN de calmodulina proporcionada en SEQ ID NO: 1 y 2, se alimentan fragmentos de ARN o ADN de cadena doble o de cadena simple en orientación sentido o antisentido o ambas *in vitro* a ácaros *Varroa* desarrollados en una placa petri o se aplican tópicamente a colmenas de abejas para efectuar la expresión de los genes diana de CAM y obtener una reducción en la población de los ácaros *Varroa* destructor.

EJEMPLO 2

Supresión de genes de calmodulina (CAM) de *Varroa destructor*

Se proporcionan polinucleótidos para la supresión de la expresión de genes de *calmodulina* (CAM) en el ácaro *Varroa destructor* correspondientes a SEQ ID NO: 3 y 4 (tabla 2) y se utilizaron para suprimir la expresión de genes de *calmodulina* (CAM) en el ácaro *Varroa destructor*. Las SEQ ID NO: 3 y 4 describen una secuencia de polinucleótidos de ARNbc de 373 bp y una secuencia de polinucleótidos de ARNbc de 186 bp, respectivamente, seleccionadas de CAM-1 (SEQ ID NO: 1). SEQ ID NO: 3, correspondiente al polinucleótido de ARNbc CAM_L/CAM373 cubre la mayoría del marco de lectura abierto del gen CAM-1 (SEQ ID NO: 1) de *calmodulina*. SEQ ID NO 4, correspondiente al polinucleótido de ARNbc CAM_S/CAM186 es un fragmento parcial de CAM_L/CAM373 (SEQ ID NO: 3) y también se deriva de CAM-1 (SEQ ID NO: 1). SEQ ID NO: 5 en la tabla 2 es una secuencia de polinucleótidos de la secuencia de ARNbc de control con una identidad de secuencia no mayor que 19 bp con cualquier gen de *Varroa destructor* conocido.

TABLA 2

ARNbc dirigido a genes de calmodulina (CAM) de *Varroa destructor*

Nombre de ARNbc	SEQ ID	Secuencia de ácido nucleico
CAM_L/ CAM373	3	ACAGAUCCGCCGAGUUCACAAAGAGGCGUUUAGCCUGUUUGACAAGGACGGAGAU GGCACGAUCACGACAAAGGAGCUCGGUACGGUAAUUGCAUCUCUCGGCCAGA ACCCACUGAGGCUGAACUGCAGGACAUGAUCAACGAGGUCGACGCCGACGG CUCCGGAACGAUAGAUUUCUGAGUUCUACACAAUGAUUGGCAAGAAAGAU AAGGACACCGACUCGGAGGAGGAGAUCCGAGAGGCGUUCGCGUUAUUCGACA AGGAUGGCAACGGUUUCAUUCGGCGGCCGAGCUCAGGCACGUUAUGACCAA CCUUGGCGAGAAGCUUACGGACGAGGAGGUAGAUGAGAUGAUUCGGGAGGC AGAUUUGAC
CAM_S/ CAM186	4	ACAAUGAUUGGCAAGAAAGAUAGAAGGACACCGACUCGGAGGAGGAGAUCCGAG AGGCGUUCGCGUUAUUCGACAAGGAUGGCAACGGUUUCAUUCGGCGGCCG AGCUCAGGCACGUUAUGACCAACCUUGGCGAGAAGCUUACGGACGAGGAGGU AGAUGAGAUGAUUCGGGAGGCAGAUUUGAC
SCRAM	5	AUACUUACUGGUGCUAAUUUUUUAUCGAGGAUGCCCAACUCCCCCACUUUAA AACUGCGAUCAUACUAAACGAACUCCCGAAGGAGUGAAAGGUGUCUAUGUUGA GCUUAAUAACCUACCUUGCGAGCAAAGAAGGACUAGUUGACCCUGGGCACCC UAUAUUGUUAUGUUGUUCGAACUGAGUUGGCACCAUGCUGCACAUGCAAC AAACAUGUCGGCCUUCGUGUCUAUCCUAGAAAAGUACCUGUGAACUUGGCUG UCUACAUCAUCAUC

EJEMPLO 3

Bioensayo de *Varroa destructor* 3 días después del tratamiento con ARNbc específicos

Se recolectaron ácaros hembra adultos de colonias de abejas melíferas y se colocaron en una placa petri sobre una solución de dieta artificial que contenía una mezcla de 1 % de triptona, 0.5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl y 15 mg/mL de agar. En este ejemplo, la dieta se suplementó con 50 µg de kanamicina por 1 mL de solución de la dieta. La solución de agar/dieta se suplementó adicionalmente con 200-500 µg/mL de ARNbc y la solución resultante se vertió en una placa petri. El ARNbc en este ejemplo consiste en SEQ ID NO: 3 (CAM_L/CAM373) o SEQ ID NO: 5 (SCRAM). Se aplicaron quince ácaros a cada placa y el experimento se realizó por triplicado. Se incubaron las placas de la dieta con los ácaros a 29 °C con 50-60 % de humedad relativa. En intervalos de tiempo específicos, se inspeccionaron las placas y se contaron y extrajeron los ácaros muertos. Para los estudios de mortalidad, se contaron los ácaros tres días después de su colocación en la dieta (FIG. 2). La FIG. 2 muestra que todos los ácaros murieron tres días después del tratamiento en comparación

con las placas no tratadas o las placas en las cuales los ácaros se alimentaron con una dieta suplementada con el polinucleótido de ARNbc no específico (SCRAM).

EJEMPLO 4

Bioensayo de *Varroa destructor* 5 días después del tratamiento con ARNbc dirigidos a calmodulina

- 5 Se recolectaron ácaros hembra adultos de colonias de abejas melíferas y se colocaron en una placa petri sobre una solución de dieta artificial. La dieta artificial contenía una mezcla de 1 % de triptona, 0.5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl y 15 mg/mL de agar. En este ejemplo, la dieta se suplementó adicionalmente con solución antimicótica (100x, Sigma Aldrich) a 8x de concentración final, 500 µg/mL de kanamicina y 220 U/mL de nistatina. La solución de agar/dieta se suplementó adicionalmente con 200-500 µg/mL de ARNbc y la
- 10 solución resultante se vertió en una placa petri. El ARNbc en este ejemplo consiste en SEQ ID NO: 3 (CAM_L/CAM373) o SEQ ID NO: 4 (CAM_S/CAM186) o SEQ ID NO: 5 (SCRAM). Se aplicaron quince ácaros a cada placa y el experimento se realizó por triplicado. Se incubaron las placas de la dieta con los ácaros a 29 °C con 50-60 % de humedad relativa. En intervalos de tiempo específicos, se inspeccionaron las placas y se contaron y extrajeron los ácaros muertos. Para los estudios de mortalidad, se contaron los ácaros cinco días
- 15 después de su colocación en la dieta (FIGS. 3A y 3B). Para el análisis molecular, se retiraron los ácaros vivos de las placas, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se realizó un análisis TAQMAN™ para evaluar los niveles de ARN de *calmodulina* (CAM). FIG. 3A, los niveles de ARN para los genes de *calmodulina* (CAM) en los ácaros expuestos a SEQ ID NO: 3 (CAM_L/CAM373) o SEQ ID NO: 4 (CAM_S/CAM186) se redujeron mucho en comparación con el tratamiento no específico (SCRAM) o la ausencia de tratamiento (CNTR). FIG. 3B, se observó una mortalidad estadísticamente significativa en los ácaros que se expusieron a ARNbc contra calmodulina (CAM) 5 días después del tratamiento.
- 20

EJEMPLO 5

Método para administrar polinucleótidos de ARNbc dirigidos a genes de *Varroa* utilizando una formulación secada por aspersión o semisólida

- 25 Se preparó ARNbc utilizado para suprimir la expresión de genes de *calmodulina* (CAM) diana de *Varroa* en una formulación que contenía 1 parte de ARNbc y ~14 partes de trehalosa en un amortiguador de fosfato (una solución de 1,15 mM KH₂PO₄ (monobásico) y 8 mM Na₂HPO₄ (dibásico), pH 8,0) como se ilustró en la tabla 3. Utilizando una secadora por aspersión mini Büchi B-290, se pulverizó la formulación líquida en gotas y se calentó con gas para producir un polvo fluido.

30

TABLA 3

Preparación de la formulación

ARNbc	Amorti- guador inicial (X % p/v trehalosa + amortiz. -guador de fosfato)	Amorti- guador final (X % p/v tre- halosa + amortiz. -guador de fosfato)	Vol. total (mL)	Amorti- guador inicial (mL)	Solución madre de ARNbc (mL)	Propo- r-ción	Concen- tración de ingredie- nte activo (IA) (mg/mL)	Concen- tración de ingredien- te activo (IA) (%) de sólidos)	Propor- ción de IA (ARNbc) a amorti- guador (tre- halosa + amortig- uador de fosfato)
CAM_L/CAM 373	40	10	110 0	275.00	825.00	¼	7.20	0.720	13.9
CAM_S/CAM 186	40	10	128 5	321.21	963.75	¼	6.75	0.675	14.8

- 35 Se formularon las partículas resultantes con azúcar en polvo y se aplicaron de forma pareja a las colmenas mediante esparcimiento del azúcar en polvo de forma pareja sobre los marcos. En otros aspectos, se preparó una preparación semisólida del material secado por aspersión con agua y la formulación de azúcar-agua ("abeja-dulce") se suministra a las colmenas de abejas dejando que las abejas se alimenten de esta.

EJEMPLO 6

Reducción *in vivo* del ácaro *Varroa* en colmenas de abejas después de tratamiento con ARNbc dirigido a genes de *Calmodulina* (CAM)

Se recolectaron ácaros *Varroa* que estaban infestando abejas melíferas adultas en las colmenas y se contaron utilizando una metodología de conteo de ácaros estándar. Se trataron las colmenas con ARNbc secado por aspersión de acuerdo con el ejemplo 7 que comprende SEQ ID NO: 3 (CAM-L), SEQ ID NO: 4 (CAM-S) o sin tratamiento (CONTROL). Se evaluó la carga de ácaros de cada colmena al comienzo del experimento y 2 semanas, 4 semanas y 12 semanas después del tratamiento. La FIG. 4 muestra la carga de ácaros de las colmenas tratadas en comparación con las colmenas que no recibieron el tratamiento. Se normalizó la cantidad de ácaros contada a 100 abejas adultas y representa la carga de ácaros *Varroa*.

EJEMPLO 7

Detección de ARN pequeños transitorios en *Varroa* después del tratamiento con genes de *Calmodulina* (CAM) dirigidos a ARNbc.

Se recolectaron ácaros *Varroa* de las colmenas tratadas con polinucleótidos de ARNbc de SEQ ID NO: 3 y se recolectaron de la colmena 7 días después del tratamiento. Se extrajo el ARN de *Varroa* y se realizó un análisis de secuenciación de ARN pequeño utilizando la plataforma SOLiD. La mayoría de las moléculas de ARN pequeño se detectaron fuera de la región de la secuencia de ARNbc y específicamente hacia la parte 3' de la región de ARNbc de SEQ ID NO: 3. Además, la mayoría de las lecturas transitorias fueron en la orientación antisentido con relación a la secuencia de transcripción de genes de *Calmodulina* (CAM). Además, se detectaron ARN pequeños específicos para CAM-2 (SEQ ID NO: 2) en este experimento a pesar de que las colmenas se trataron con ARNbc para la SEQ ID NO: 3, que se prevé que es específica para CAM-1 (SEQ ID NO: 1). Esta observación apoya la hipótesis de que la supresión de la expresión de ARN y la generación de ARN pequeño transitorio en *Varroa* funciona incluso cuando solo un pequeño fragmento entre los dos genes comparte identidad completa a nivel del ADN (en este caso 23 nucleótidos).

EJEMPLO 8

Homólogos de genes de *Calmodulina* (CAM) de especies de plagas y parásitos de artrópodos y polinucleótidos de ARNbc correspondientes

Utilizando una técnica de bioinformática estándar y las secuencias SEQ ID NO: 1 y 2 para *Varroa destructor*, se identificó un conjunto de 31 secuencias de genes de calmodulina (CAM) conservadas en especies de plagas de artrópodos que infestan o bien otros artrópodos o mamíferos y que se focalizarán para la regulación génica. Se identificaron estas secuencias y se presentaron como un árbol filogenético en la FIG. 1. Las secuencias de ADN en la FIG. 1 se analizaron adicionalmente mediante la identificación del dominio de 373 bp conservado dentro de cada secuencia que corresponde a SEQ ID NO: 3 (CAM_L/CAM373). La tabla 4 enumera las SEQ ID NO de las secuencias de genes de *calmodulina* (CAM) recién identificadas, así como las secuencias disparadoras de polinucleótidos de ARNbc de 373 bp correspondientes. Las secuencias de ARNbc de polinucleótidos de 373 bp se evaluarán ya sea solas o en combinación en ensayos de alimentación directa contra su especie de artrópodo respectiva.

TABLA 4

Las secuencias de genes de calmodulina (CAM) identificadas de plagas o parásitos de artrópodos y sus polinucleótidos de ARN de 373 bp correspondientes

SEQ ID NO	Nombre del gen	Organismo/especie	Tipo
6	CAM-3	<i>Varroa destructor</i>	ADNc
7	CAM-1	<i>Ixodes scapularis</i>	ADNc
8	CAM-1	<i>Aedes aegypti</i>	ADNc
9	CAM-1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ADNc
10	CAM-1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ADNc
11	CAM-1	<i>Harpegnathos saltator</i>	ADNc
12	CAM-1	<i>Pediculus humanus corporis</i>	ADNc
13	CAM-1	<i>Anopheles gambiae</i>	ADNc
14	CAM-1	<i>Solenopsis invicta</i>	ADNc

ES 3 008 698 T3

15	CAM-1	<i>Ixodes scapularis</i>	ARN
16	CAM-1	<i>Aedes aegypti</i>	ARN
17	CAM-1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ARN
18	CAM-1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ARN
19	CAM-1	<i>Harpegnathos saltator</i>	ARN
20	CAM-1	<i>Pediculus humanus corporis</i>	ARN
21	CAM-1	<i>Anopheles gambiae</i>	ARN
22	CAM-1	<i>Solenopsis invicta</i>	ARN
23	CAM-3	<i>Varroa destructor</i>	ARN
24	CAM-1	<i>Tetranychus urticae</i>	ADNc
25	CAM-1	<i>Tetranychus urticae</i>	ARN
26	CAM-4	<i>Varroa destructor</i>	ADNc
27	CAM-4	<i>Varroa destructor</i>	ARN
28	CAM-5	<i>Varroa destructor</i>	ADNc
29	CAM-5	<i>Varroa destructor</i>	ARN
30	CAM-7	<i>Varroa destructor</i>	ADNc
31	CAM-7	<i>Varroa destructor</i>	ARN
32	CAM-8	<i>Varroa destructor</i>	ADNc
33	CAM-8	<i>Varroa destructor</i>	ARN
34	CAM-9	<i>Varroa destructor</i>	ADNc
35	CAM-9	<i>Varroa destructor</i>	ARN
36	CAM	<i>Ixodes scapularis</i>	ADNc
37	CAM	<i>Ixodes scapularis</i>	ARN
38	CAM	<i>Ixodes scapularis</i>	ADNc
39	CAM	<i>Ixodes scapularis</i>	ARN
40	CAM	<i>Ixodes scapularis</i>	ADNc
41	CAM	<i>Ixodes scapularis</i>	ADNc
42	CAM	<i>Ixodes scapularis</i>	ARN
43	CAM	<i>Aedes aegypti</i>	ADNc
44	CAM	<i>Aedes aegypti</i>	ARN
45	CAM	<i>Aedes aegypti</i>	ADNc
46	CAM	<i>Aedes aegypti</i>	ARN
47	CAM	<i>Aedes aegypti</i>	ADNc
48	CAM	<i>Aedes aegypti</i>	ARN
49	CAM	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ADNc

50	CAM	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ARN
51	CAM	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ADNc
52	CAM	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ARN
53	CAM	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ADNc
54	CAM	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ARN
55	CAM	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ADNc
56	CAM	<i>Culex quinquefasciatus</i>	ARN
57	CAM	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ADNc
58	CAM	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ARN
59	CAM	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ADNc
60	CAM	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ARN
61	CAM	<i>Pediculus humanus</i>	ADNc
62	CAM	<i>Pediculus humanus</i>	ARN
63	CAM	<i>Pediculus humanus</i>	ADNc
64	CAM	<i>Pediculus humanus</i>	ARN
65	CAM	<i>Pediculus humanus</i>	ADNc
66	CAM	<i>Pediculus humanus</i>	ARN
67	CAM	<i>Pediculus humanus</i>	ADNc
68	CAM	<i>Pediculus humanus</i>	ARN

EJEMPLO 9**Transcripciones de genes de calmodulina (CAM) de Varroa y secuencias disparadoras de ARNbc**

- 5 Se utilizaron las secuencias de calmodulina (CAM) proporcionados en la tabla 5 (SEQ ID NO: 69 y 70), o sus transcripciones correspondientes, como dianas de composiciones de polinucleótidos que comprenden un polinucleótido con al menos 18 nucleótidos contiguos idénticos o complementarios a dichos genes o transcripciones. Se identificaron las secuencias 5' y 3'UTR para las secuencias de calmodulina de *Varroa* mediante secuenciación de ARN.

TABLA 5**Transcripciones diana para genes de calmodulina (CAM) de Varroa destructor**

Nombre del gen y especie	SEQ ID NO	Tipo
CAM-1; <i>Varroa destructor</i>	69	ARN
CAM-2; <i>Varroa destructor</i>	70	ARN

SEQ ID NO: 69 y 70 se traslaparon en fragmentos de 150 bp. La tabla 6 ilustra la cadena superior (5'-3') para los fragmentos de 150 bp que se traslapan en SEQ ID NO: 69 y 70.

TABLA 6**Secuencias de polinucleótidos traslapadas para los genes CAM-1 y CAM-2**

Nombre del gen	SEQ ID NO	Posición dentro de secuencia de transcripción
----------------	-----------	---

CAM-1	71	1-150
CAM-1	72	151-300
CAM-1	73	301-450
CAM-1	74	451-600
CAM-1	75	601-750
CAM-1	76	751-900
CAM-1	77	901-1050
CAM-1	78	1051-1200
CAM-1	79	1201-1350
CAM-1	80	1351-1500
CAM-2	81	1-150
CAM-2	82	151-300
CAM-2	83	301-450
CAM-2	84	451-600
CAM-2	85	601-750
CAM-2	86	751-900
CAM-2	87	901-1050

Se proporciona uno o más ARNbc que comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 71-87 *in vitro* a ácaros *Varroa* desarrollados en una placa petri o aplicados tópicamente a colmenas de abejas para efectuar la expresión de los genes diana de CAM y obtener una reducción en la población de los ácaros *Varroa destructor*.

EJEMPLO 10

Bioensayo *in vitro* de disparadores dirigidos a calmodulina (CAM) en el ácaro *Varroa*

Se generaron secuencias disparadoras de polinucleótidos dirigidas a Calmodulina (CAM)-1 y 2 basándose en la superposición de secuencias conservadas entre las secuencias CAM-1 y CAM-2. Estas se presentan como SEQ ID NO: 88 y 89 (dirigidas a CAM-1 y CAM-2, respectivamente).

Se evaluaron las secuencias de polinucleótidos seleccionadas de SEQ ID NO: 88 y 89 en un bioensayo *in vitro* en cuando a su capacidad de suprimir la viabilidad de los ácaros *Varroa* adultos. Se recolectaron ácaros hembra adultos de colonias de abejas melíferas y se colocaron en una placa petri sobre una solución de dieta artificial. La dieta artificial contenía una mezcla de 1 % de triptona, 0.5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl y 15 mg/mL de agar. En este ejemplo, la dieta se suplementó adicionalmente con solución antimicótica (100x, Sigma Aldrich) a 8x de concentración final, 500 µg/mL de kanamicina y 220 U/mL de nistatina. La solución de agar/dieta se suplementó adicionalmente con 200-500 µg/mL de ARNbc y la solución resultante se vertió en una placa petri. El ARNbc en este ejemplo consiste en SEQ ID NO: 3 (CAM373), SEQ ID NO: 88 (CAM-1) o SEQ ID NO: 89 (CAM-2) o control no tratado (NTC). Se aplicaron quince ácaros a cada placa y el experimento se realizó por triplicado. Se incubaron las placas de la dieta con los ácaros a 29 °C con 50-60 % de humedad relativa. En intervalos de tiempo específicos, se inspeccionaron las placas y se contaron y extrajeron los ácaros muertos. Para los estudios de mortalidad, se contaron los ácaros cinco y seis días después de su colocación en la dieta (FIG. 5). Además, se mezclaron el ARNbc para SEQ ID NO: 88 (CAM-1) y SEQ ID NO: 89 (CAM-2) en una cantidad equimolar y se suministraron como se describió anteriormente a los ácaros. La figura 6 muestra el resultado de esta aplicación.

Para el análisis molecular, se retiraron los ácaros vivos de las placas, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se realizó un análisis TAQMAN™ para evaluar los niveles de ARN de *calmodulina* (CAM).

EJEMPLO 11

Reducción de campo *in vivo* de infestación del ácaro *Varroa* en colmenas de abejas tratadas en el campo después de tratamiento con ARNbc dirigido al gen de *Calmodulina* (CAM)

- Se preparó el ARNbc utilizado para suprimir la expresión de los genes de calmodulina (CAM) dirigidos a *Varroa* mediante la mezcla de solución madre de ARNbc en amortiguador de fosfato con 66 % de jarabe de azúcar.
- 5 Se suministró la formulación líquida como un jarabe a las abejas, se dejó que se alimentaran de este hasta su consumo total (aproximadamente 2-3 días). Cada grupo de evaluación de campo consistió en 33 colmenas. Los grupos consistían en colmenas no tratadas, tratadas con disparador no específico (SEQ ID NO: 5) y tratadas con disparador específico (SEQ ID NO: 3). Se trató a las abejas en dos series, cada serie consistía en dos alimentaciones con dos semanas de separación: al inicio de la administración (semana 0) y dos semanas
- 10 más tarde (semana 2), después nuevamente en la semana 13 y 15. La evaluación de la supervivencia de las abejas se realizó en las semanas 4, 9, 13, 15 y 17 (Fig. 7). Se observó una supresión significativa de la población de *Varroa* después del tratamiento con el disparador específico (SEQ ID NO:3) en la semana 9.

REIVINDICACIONES

1. Una composición acaricida selectiva que comprende una molécula de ácido nucleico acaricida que tiene una secuencia que es esencialmente complementaria a una región de la secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor*, o un ARN transcrito a partir de la misma, en la que dicha composición es ingerible o absorbible por los ácaros.
2. Una composición ingerible por los ácaros que comprende un alimento para abejas y una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es esencialmente complementaria a una región de la secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor*, o un ARN transcrito a partir de la misma.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que:
 - (a) dicha molécula de ácido nucleico es un ARNbc o un ARNip; o
 - (b) dicha composición comprende además un excipiente, en la que dicho excipiente se selecciona del grupo que consiste en proteína, polen, carbohidrato, polímero, disolvente líquido, jarabe de azúcar, azúcar sólido y alimento semisólido.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que:
 - (a) dicho disolvente líquido se selecciona del grupo que consiste en solución de sacarosa y solución de jarabe de maíz; o
 - (b) dicha proteína se selecciona del grupo que consiste en polen y proteína de soja; o
 - (c) dicho excipiente es un sólido seleccionado de azúcar, un sustituto de azúcar o un suplemento de azúcar; o
 - (d) dicho azúcar sólido comprende micropartículas de azúcar impregnadas con dicha secuencia de ácido nucleico de ARNbc; o
 - (e) dicha secuencia del gen de calmodulina tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 23, 26-35 y 69-89; o
 - (f) en la que dicha secuencia del gen de calmodulina comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 23, 26-35 y 69-89; o
 - (g) en la que dicha secuencia de ARNbc es un ARNbc correspondiente a una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre las SEQ ID NOS: 3, 4 y 71-89.
5. Una composición para su uso en la reducción de la parasitación de una abeja melífera por *Varroa destructor*, en la que el uso comprende proporcionar a la abeja una cantidad eficaz de una composición de ácido nucleico, en la que dicho ácido nucleico es esencialmente complementario a una región de una secuencia de gen de calmodulina de *Varroa destructor*, o un ARN transcrito a partir de la misma, reduciendo de este modo la parasitación de dicha abeja por *Varroa destructor*.
6. Una composición para su uso en la reducción de la carga parasitaria de una colmena de abejas melíferas, en la que el uso comprende proporcionar a dicha colmena una cantidad eficaz de un ácido nucleico que es esencialmente complementario a una región de una secuencia de gen de calmodulina de *Varroa destructor*, o un ARN transcrito a partir de la misma, con lo que se reduce la carga de *Varroa destructor* de dicha colmena.
7. Una composición para su uso en el tratamiento selectivo de abejas melíferas contra parásitos *Varroa destructor*, en la que el uso comprende administrar a las abejas melíferas una cantidad eficaz de un ácido nucleico que es esencialmente complementario a una región de una secuencia del gen de calmodulina de *Varroa destructor*, o un ARN transcrito a partir de la misma.
8. La composición para su uso de la reivindicación 5, en la que dicha abeja melífera es una abeja de una colonia y dicho tratamiento reduce la susceptibilidad de dicha colonia de abejas a *Varroa destructor*.
9. La composición para su uso de la reivindicación 5, en la que dicha reducción de la parasitación de dicha colonia de abejas comprende una supervivencia de menos del 25 %, 15 %, 10 % o 5 % de dicho *Varroa destructor*.

10. La composición para su uso de la reivindicación 7, en la que:

(b) dicha administración comprende la administración a través de un comedero; o

(c) en la que dicha administración comprende la pulverización sobre los marcos de la colmena; o

5 (d) en la que dicha administración comprende la administración por contacto utilizando un dispositivo intracolmena impregnado con dicha composición.

11. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que:

(a) dicho ácido nucleico es un ARNbc o un ARNip;

10 (b) en la que dicha secuencia del gen de calmodulina tiene al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NOs: 1-4, 6, 23, 26-35 y 69-89; o

(c) en la que dicha secuencia del gen de calmodulina comprende al menos 18 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NOs: 1-4, 6, 23, 26-35 y 69-89.

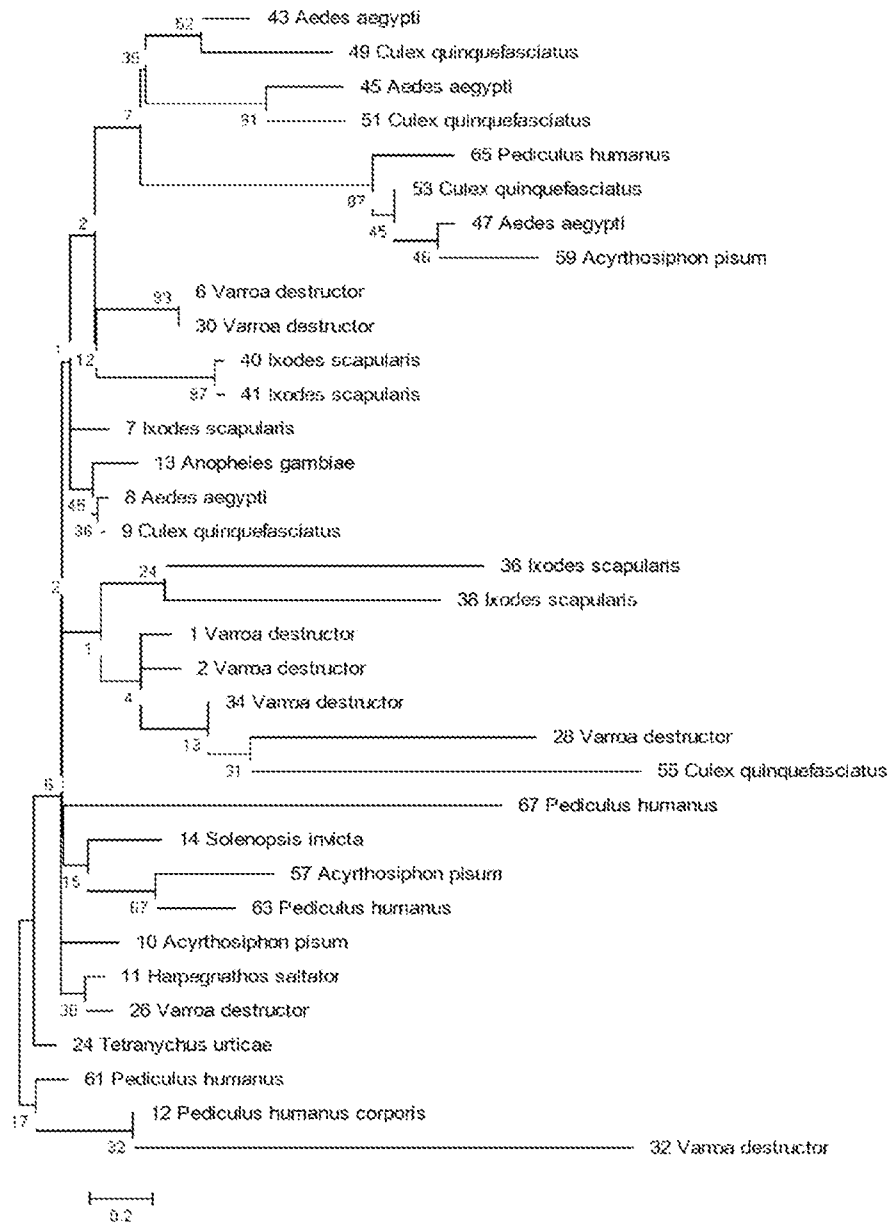


FIG. 1

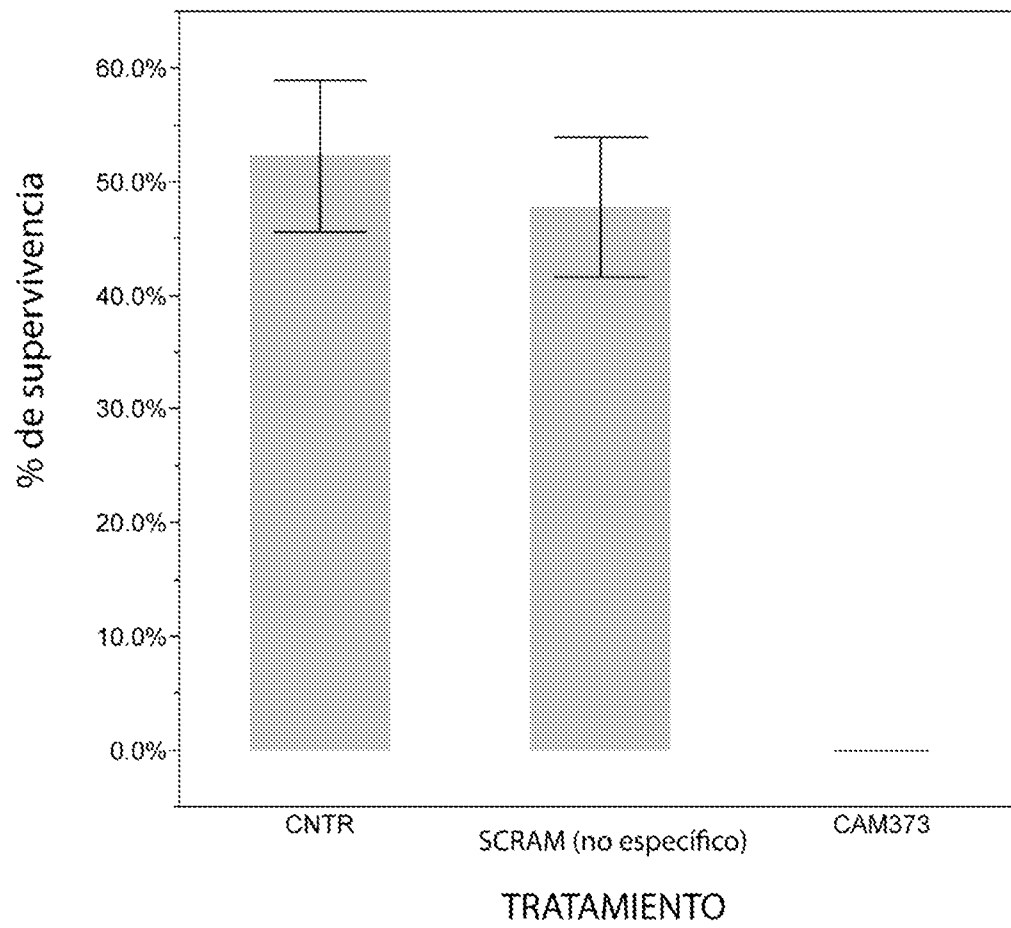


FIG. 2

FIG. 3A

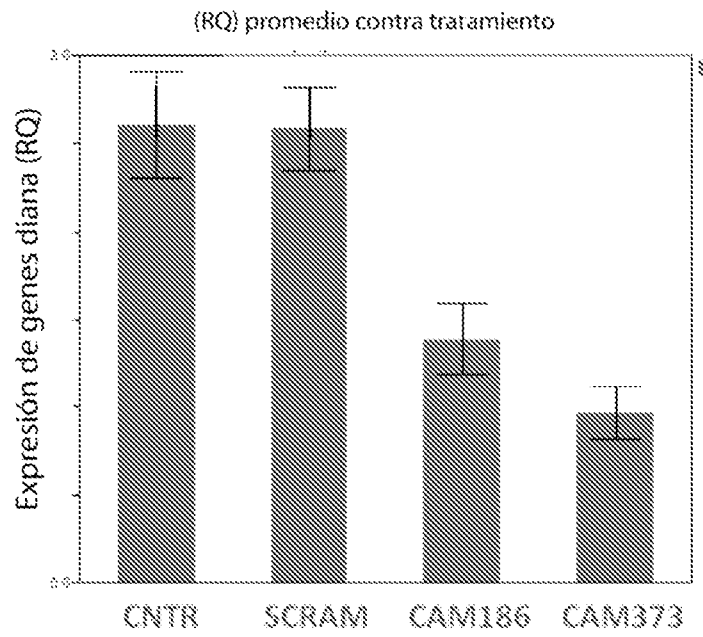
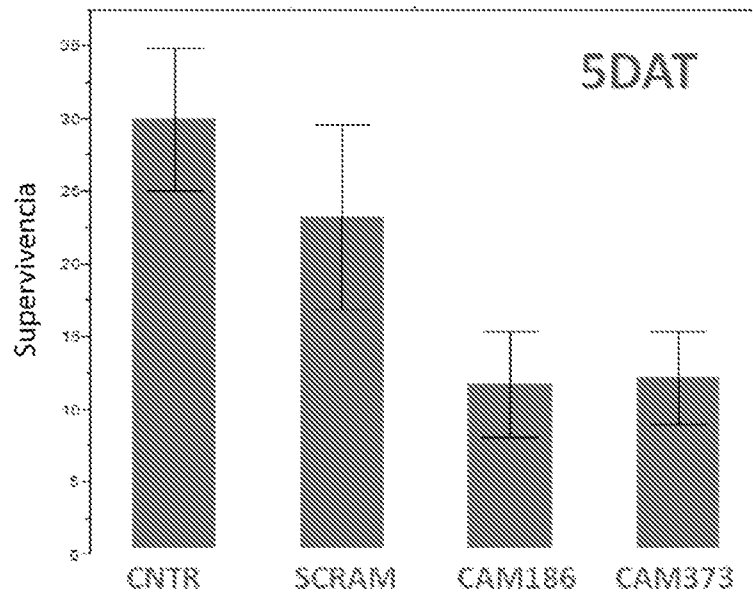


FIG. 3B



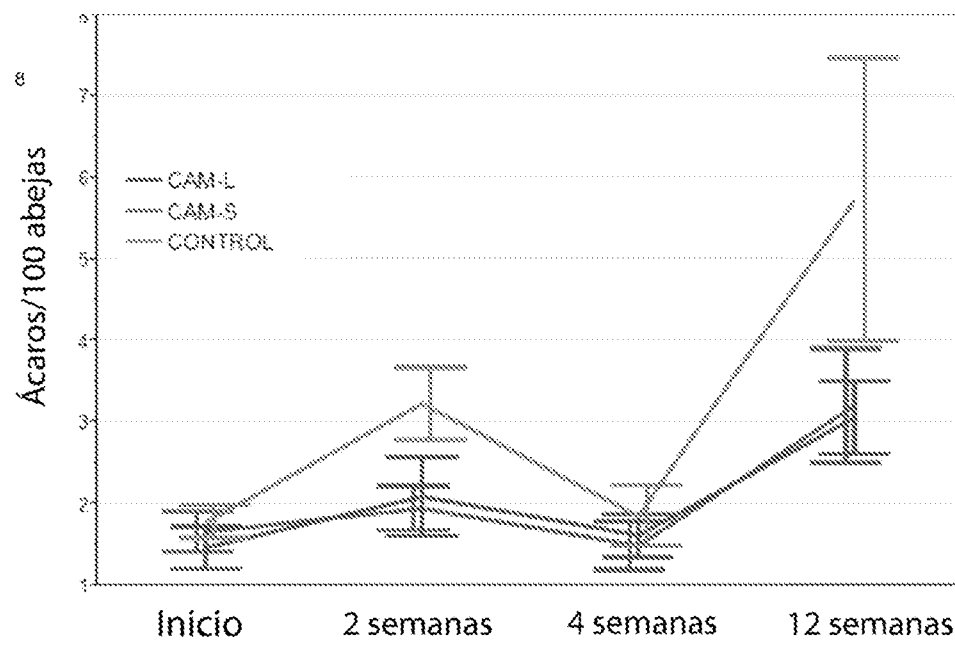


FIG. 4

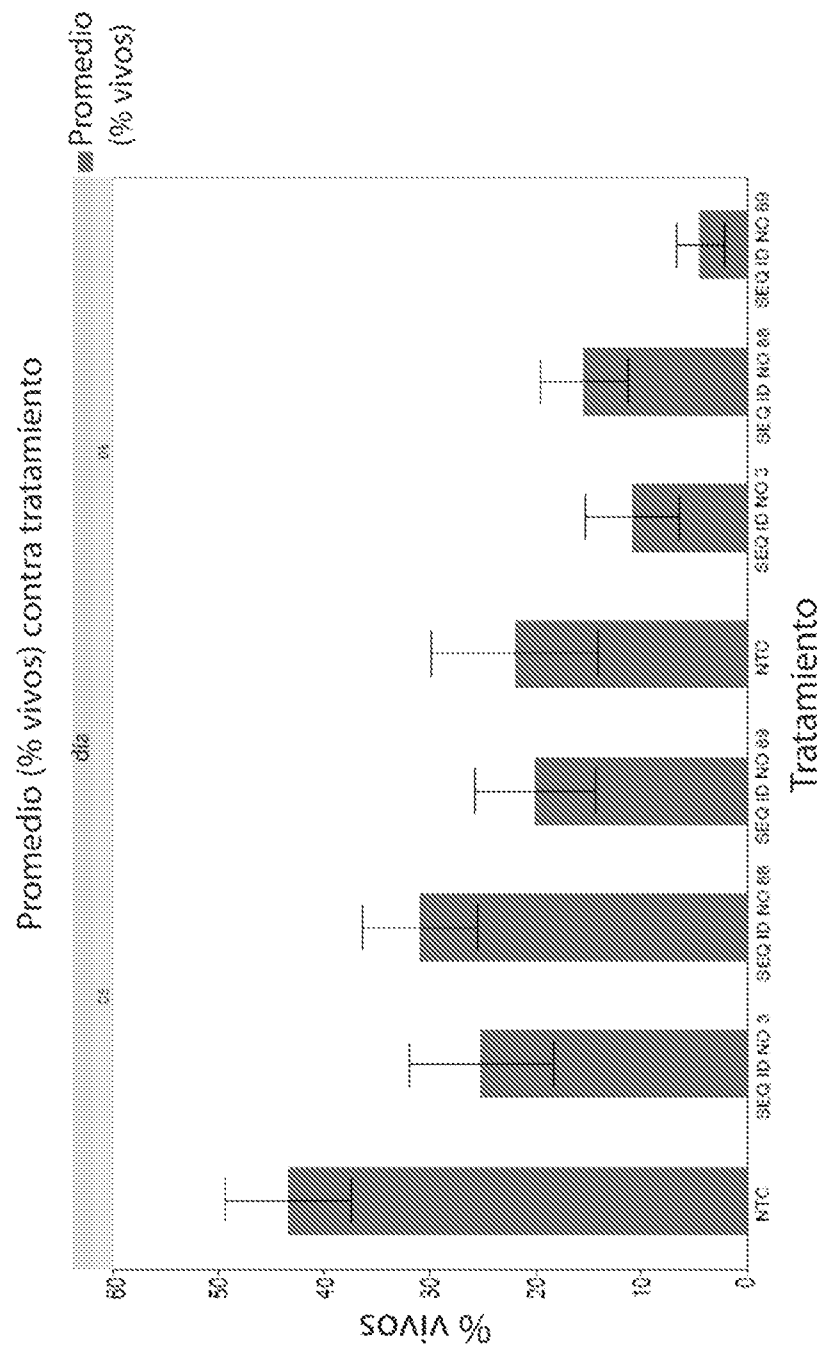


FIG. 5

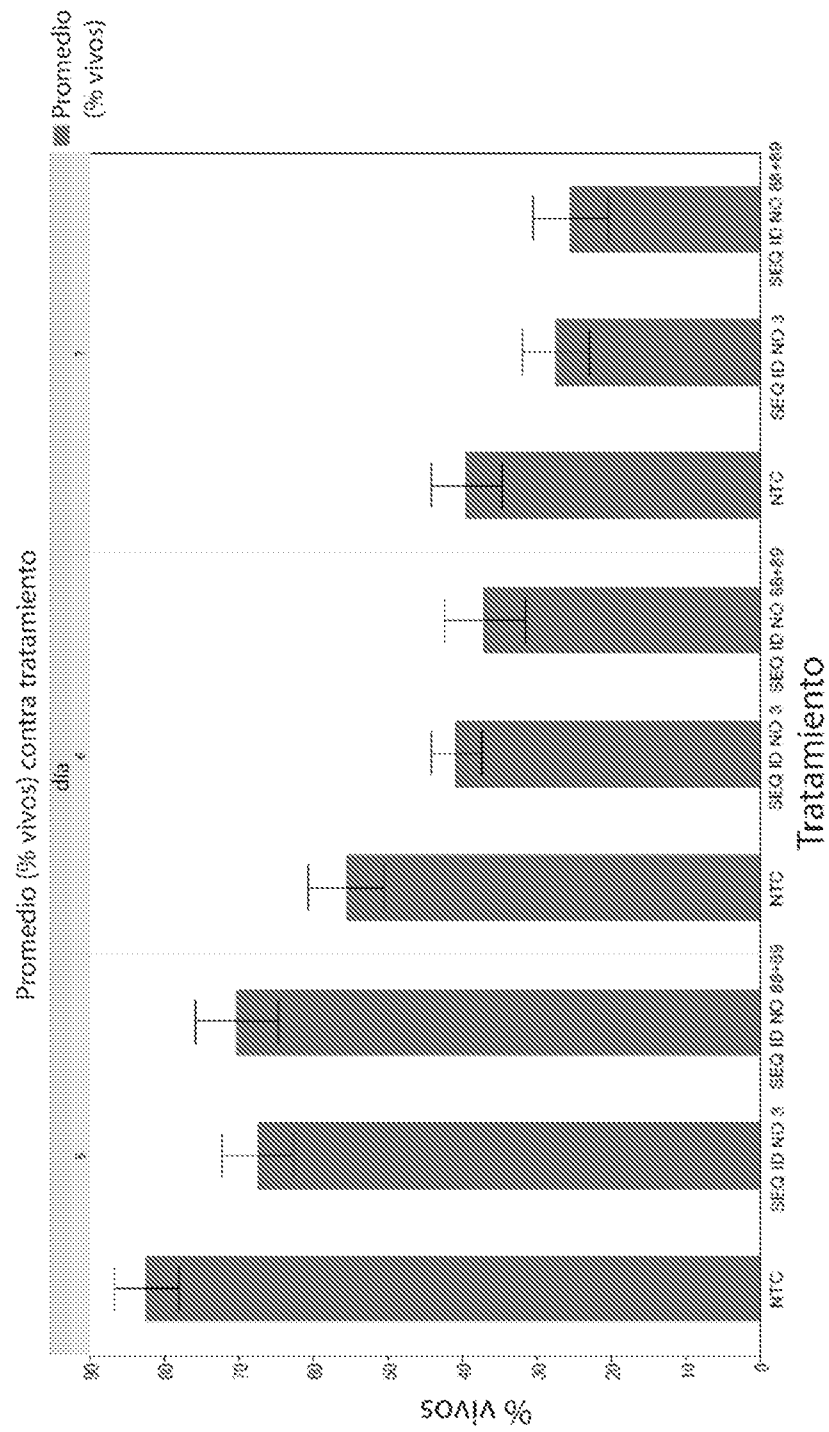


FIG. 6

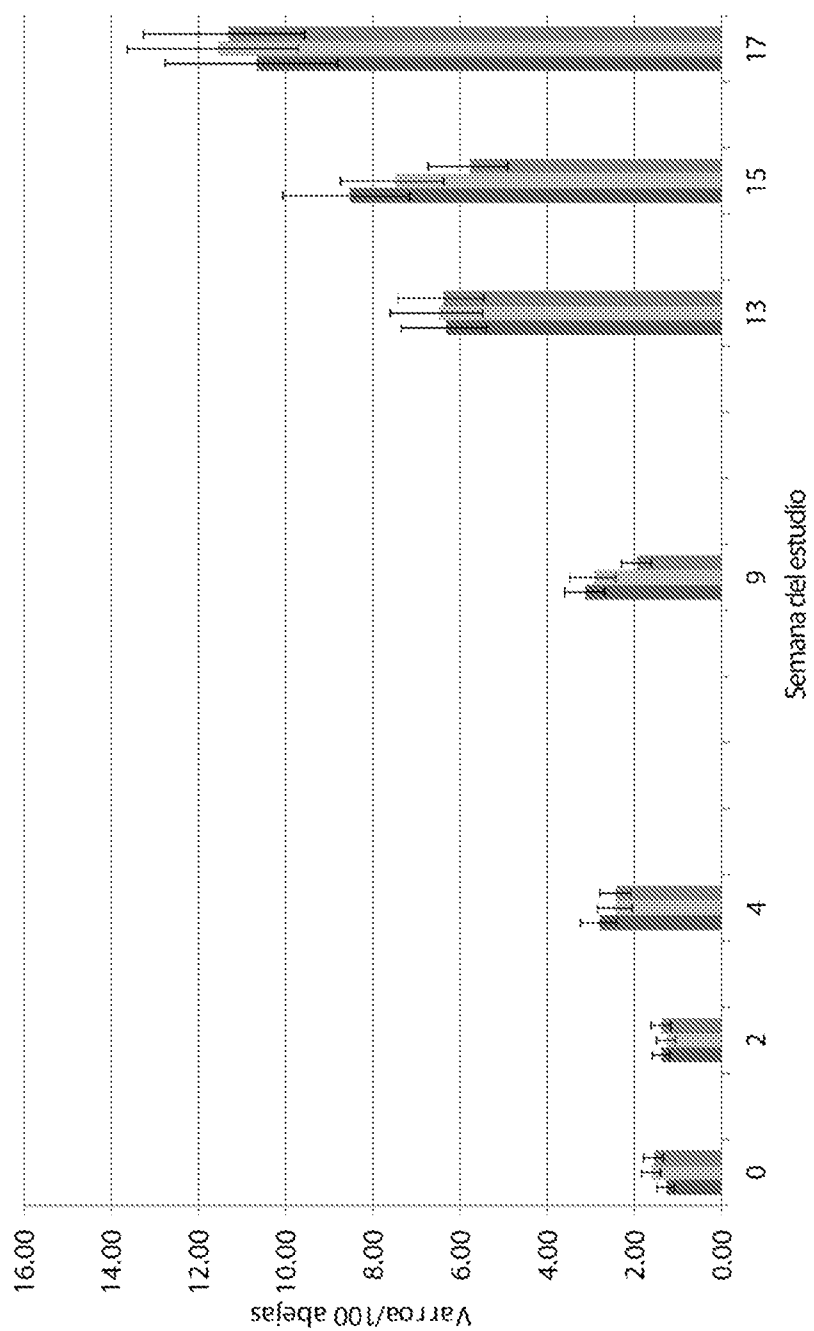


FIG. 7