

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E  
AMBIENTE

**Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari**

## **L'RNA INTERFERENCE (RNAi) COME TECNOLOGIA INNOVATIVA PER IL CONTROLLO DEGLI INFESTANTI NEL SETTORE AGROALIMENTARE**

Relatore: Prof. Isabel Martínez Sañudo

Laureando: Crivellaro Riccardo

2007843

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

## INDICE

<i>Abstract</i> .....	2
1. Introduzione: L'RNAi come tecnologia per uno sviluppo sostenibile.....	4
2. RNA Interference come strategia biotecnologica di controllo degli infestanti.....	6
2.1 Il meccanismo molecolare.....	6
2.2 Vantaggi dell'impiego dell'RNAi e profilo di biosicurezza.....	9
2.2.1 Specificità d'azione e protezione degli organismi non-target.....	9
2.2.2 Biodegradabilità ed assenza di residui persistenti.....	10
2.2.3 Barriere fisiologiche e sicurezza per la salute umana.....	11
2.3 Limiti attuali e criticità nell'implementazione su larga scala.....	11
2.3.1 Barriere biochimiche e fisiologiche.....	11
2.3.2 Sfide logistiche nell'ambiente molitorio.....	12
2.3.3 Sostenibilità economica e sviluppo su larga scala.....	13
3. Caso studio: <i>Tribolium castaneum</i> .....	14
3.1 Inquadramento biologico e caratteristiche bio-morfologiche.....	14
3.2 Degradazione delle derrate e impatto economico sulla filiera.....	16
3.3 Sensibilità del modello al silenziamento genico tramite RNAi.....	18
3.3.1 Caratteristiche molecolari e meccanismi di risposta.....	19
3.3.2 Validazione sperimentale ed identificazione di target letali.....	19
4. Conclusioni e prospettive future.....	21
Bibliografia.....	22

## ***Abstract***

Il presente elaborato analizza l'impiego della tecnologia a RNA interferente (RNAi) quale alternativa sostenibile ai fumiganti di sintesi, in linea con le strategie europee *Farm to Fork* e *Green Deal* che prevedono crescenti restrizioni normative sull'uso dei pesticidi nell'Unione Europea. L'obiettivo centrale dello studio è valutare l'applicabilità del silenziamento genico tramite dsRNA nella protezione dei prodotti cerealicoli, con un focus specifico sulla gestione di *Tribolium castaneum*. Nella prima parte del lavoro, viene esaminato il pathway molecolare dell'RNAi e le basi biologiche che rendono tale insetto un modello ideale per il silenziamento sistemico. Successivamente, vengono analizzati i vantaggi in termini di biosicurezza e specificità d'azione, affrontando al contempo le barriere fisiologiche e biochimiche che ne condizionano l'efficacia. In conclusione, l'analisi evidenzia il potenziale dell'RNAi come strumento di precisione per la difesa delle derrate, sottolineandone i vantaggi in termini di biosicurezza alimentare e le criticità tecniche che ne ostacolano l'applicazione su larga scala.

## *Abstract*

This paper analyzes the use of RNAi technology as a sustainable alternative to synthetic fumigants, in line with the European *Farm to Fork* and *Green Deal* strategies, which entail increasing regulatory restrictions on pesticide use in the European Union. The central objective of the study is to evaluate the applicability of dsRNA gene silencing in the protection of cereal crops, with a specific focus on the management of *Tribolium castaneum*. The first part examines the molecular pathway of RNAi and the biological basis that makes this insect an ideal model for systemic silencing. Subsequently, the advantages in terms of biosafety and specificity of action are analyzed, while addressing the physiological and biochemical barriers that limit its effectiveness. Ultimately, the analysis underscores the potential of RNAi as a precision tool for food protection, emphasizing its advantages in terms of food safety and the technical challenges that hinder its large-scale application.

# 1. Introduzione - L'RNAi come Tecnologia per uno Sviluppo Sostenibile

La transizione verso sistemi alimentari sostenibili (Farm to Fork), promossa dalla Commissione Europea come parte del Green Deal, prevede tra le proprie strategie una drastica riduzione dei pesticidi di sintesi (European Commission, 2020) (Fig. 1).

Tale obiettivo mira a rendere la filiera alimentare europea più sicura per il consumo umano, grazie all'eliminazione di residui chimici, e maggiormente rispettosa dell'ambiente e della biodiversità. Questo processo richiede perciò una riduzione sostanziale nell'uso dei fumiganti quali la Fosfina ( $\text{PH}_3$ ), che pur rimanendo ad oggi molto diffuso, viene messo sempre più in discussione dall'insorgenza di fenomeni di resistenza.

La necessità di tale transizione non è dettata unicamente da esigenze ecologiche, ma anche da un rilevante impatto economico globale. Sebbene la quantificazione precisa delle perdite post-raccolta, dovute ad insetti infestanti, nell'Unione Europea sia complessa a causa della frammentazione dei dati recenti, mediante studi globali si stima che oltre il 10-15% della produzione cerealicola mondiale venga persa a causa di quest'ultimi, con picchi di oltre il 30% nei paesi in via di sviluppo, e con costi che raggiungono i miliardi di euro/dollari annui (Gerken e Morrison, 2022).

Nel contesto europeo, e in particolare in quello italiano, dove la filiera cerealicola rappresenta un'importante risorsa per l'economia agroalimentare nazionale, tali danni non si limitano alla perdita diretta di biomassa, ma includono il deprezzamento qualitativo del prodotto e un aumento nei costi per la sanificazione degli ambienti di trasformazione, come i molini.

In questo scenario, la ricerca di alternative ai fumiganti tradizionali vede nell'RNAi una delle strategie biotecnologiche più promettenti per far fronte a queste ingenti perdite economiche e ai limiti della chimica tradizionale.

Si tratta di un meccanismo di silenziamento genico ampiamente validato nella ricerca molecolare, capace di offrire una specificità d'azione senza precedenti rispetto ai pesticidi convenzionali. Tale tecnologia si pone come una soluzione versatile per il controllo degli infestanti non solo negli ammassi di granaglie durante lo stoccaggio, ma anche all'interno degli ambienti della macinazione quali molini ed impianti di produzione dei derivati dove la gestione dei residui chimici nelle farine e la protezione dei macchinari rappresentano sfide critiche. Infatti, grazie all'elevata specificità d'azione su sequenze nucleotidiche target, e alla sua biodegradabilità durante la cottura, questa tecnologia offre la possibilità di mantenere gli elevati standard di igiene e bio-sicurezza richiesti dalla moderna industria

agroalimentare lungo tutto il processo di trasformazione, riducendo drasticamente l'impatto tossicologico sui prodotti finiti.

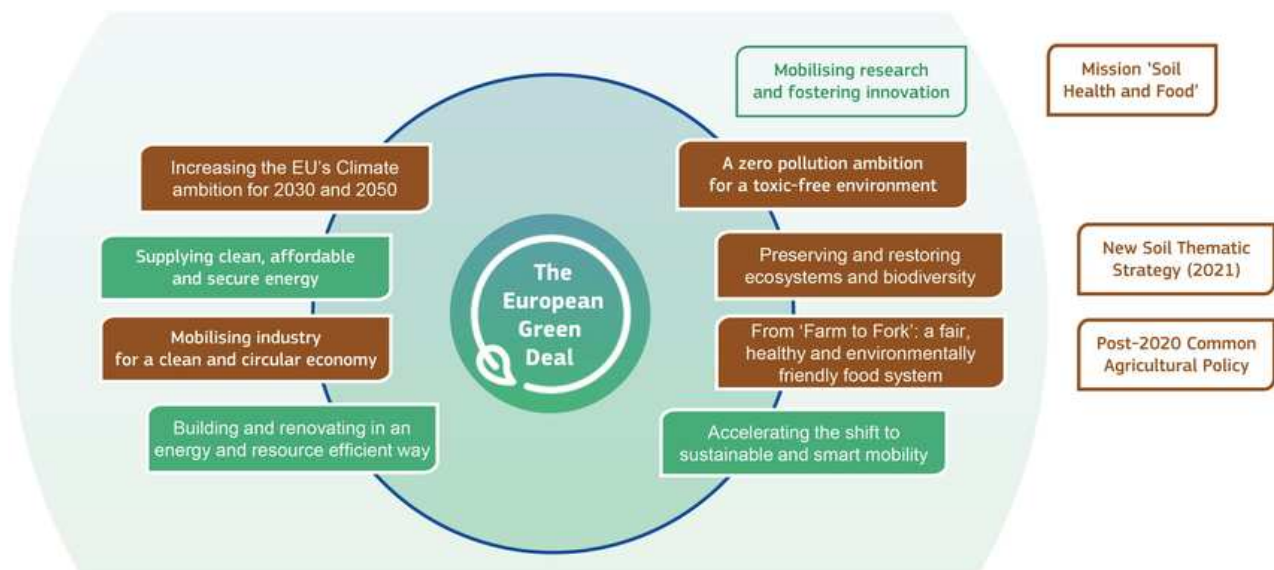
In questo contesto riveste particolare interesse il *Tribolium castaneum*, uno dei principali infestanti delle farine e derivati, nonché organismo modello nello studio dell'RNAi come mezzo di controllo sui parassiti.

Tale scelta è giustificata dall'enorme quantità di informazioni genetiche disponibili (iBeetle database ne è un esempio) (Dönitz, et al., 2015), oltre che dalla facilità di allevamento in laboratorio e dall'elevata sensibilità al silenziamento genico in ogni fase del suo ciclo vitale.

Sulla base delle premesse appena fatte, il presente elaborato si propone di analizzare le potenzialità applicative dell'RNAi, come strumento innovativo per la protezione della filiera cerealicola.

L'analisi si focalizzerà sul meccanismo di funzionamento molecolare di questa tecnologia e sulle sfide riguardanti la stabilità e il rilascio della molecola di dsRNA negli ambienti di stoccaggio e trasformazione.

In particolar modo, verrà esaminata l'efficacia dell'RNAi attraverso il caso studio del coleottero *Tribolium castaneum*, prendendo in esame vantaggi, limiti ed eventuali complicazioni attualmente presenti nell'impiego di tale strategia biotecnologica.



**Figura 1.** Schema degli obiettivi chiave dell'European Green Deal. L'infografica evidenzia la centralità della strategia *Farm to Fork* e della tutela della biodiversità. (Fonte: European Commission, 2020).

## 2. RNA Interference come Strategia Biotecnologica di Controllo degli Infestanti

Sebbene sia oggi considerato una delle frontiere più promettenti delle biotecnologie agrarie, l'RNA Interference (RNAi) è in realtà un meccanismo di difesa cellulare estremamente antico e molto ben conservato dal punto di vista evolutivo. La sua presenza è infatti riscontrabile in quasi tutti gli organismi eucarioti, dai funghi, alle piante, all'uomo (Torri, et al., 2022).

Viene scoperto inizialmente come processo di silenziamento genico post-trascrizionale, dai ricercatori americani Andrew Fire e Craig Mello, i quali nel 1998 pubblicarono sulla rivista *Nature* una loro ricerca nella quale dimostrano (mediante esperimenti fatti sul nematode *Caenorhabditis elegans*) come la causa di alcuni silenziamenti genici osservati nelle piante alla fine degli anni '80 fosse l'RNA a doppio filamento (dsRNA) (Fire, et al., 1998). Una scoperta rivoluzionaria, la quale conferì ai due ricercatori il Nobel per la medicina nel 2006.

### 2.1 Il Meccanismo molecolare

Il termine RNA Interference (RNAi) si riferisce ad una serie di processi molecolari, che fanno uso di piccoli frammenti di RNA a doppio filamento (dsRNA) progettati ad hoc per interferire con l'espressione genica. Attraverso questo pathway è possibile silenziare geni essenziali per la singola cellula, compromettendo su larga scala la crescita, il successo o la velocità di riproduzione, o la sopravvivenza dell'intero organismo.

Questo antico meccanismo difensivo rappresenta negli insetti una componente fondamentale del sistema immunitario, il quale è deputato al riconoscimento ed alla degradazione di acidi nucleici esogeni, come ad esempio quelli di origine virale (Wang, et al. 2006).

Prima di analizzare nel dettaglio questo processo, è importante sottolineare come esistano diversi percorsi per attivare il silenziamento genico, ognuno caratterizzato da una diversa classe di piccoli RNA non codificanti coinvolti (Isenmann, et al., 2023).

Tra questi possiamo citare:

- microRNAs (miRNA): utilizzati dalla cellula come regolatori per la propria espressione genica durante lo sviluppo;

- PIWI-interacting RNAs: molecole coinvolte nella protezione delle cellule germinali
- small-interfering RNAs: utili nella difesa contro gli acidi nucleici provenienti dall'esterno (esogeni).

Proprio su queste ultime molecole si basa la strategia biotecnologica dell'RNAi, ed in particolar modo sulla sua peculiarità di essere l'unico percorso in grado di interagire con molecole esogene, che nel nostro caso sono i filamenti di dsRNA progettati e sintetizzati in laboratorio.

Il dsRNA è infatti l'unico vettore programmabile con una sequenza specifica che, una volta somministrato al target, è in grado di sfruttare il macchinario cellulare preesistente dell'insetto per attivare un silenziamento mirato.

A livello molecolare, il processo di RNAi può essere suddiviso in tre fasi principali: l'innesco, il caricamento del complesso effettore ed il silenziamento genico (Fig. 2).

1. **Fase di Innesco:** Il meccanismo ha inizio quando molecole di dsRNA a lungo filamento (long dsRNA) penetrano nella cellula generalmente tramite processi di endocitosi.

In questa fase, l'enzima Dicer-2, una RNasi di tipo III che agisce da forbice molecolare, riconosce il dsRNA e lo taglia in piccoli frammenti lunghi circa 21-23 nucleotidi, denominati siRNA (small-interfering RNAs) (Perkin, et al., 2016).

In molti insetti, tra cui il *Tribolium castaneum*, questo processo può essere ulteriormente potenziato dall'azione delle RNA polimerasi RNA-dipendenti (RdRP). Questi enzimi citoplasmatici sono infatti in grado di utilizzare i filamenti di RNA come stampo per sintetizzare nuovo dsRNA esogeno, creando così un ciclo di amplificazione che garantisce una continua disponibilità di molecole trigger per il processo di silenziamento.

Tale meccanismo di sintesi viene impiegato anche in vitro per la produzione del dsRNA esogeno di partenza.

2. **Caricamento del complesso RISC:** Gli siRNA appena generati vengono successivamente caricati in un complesso multiproteico denominato RISC (RNA-Induced Silencing Complex).

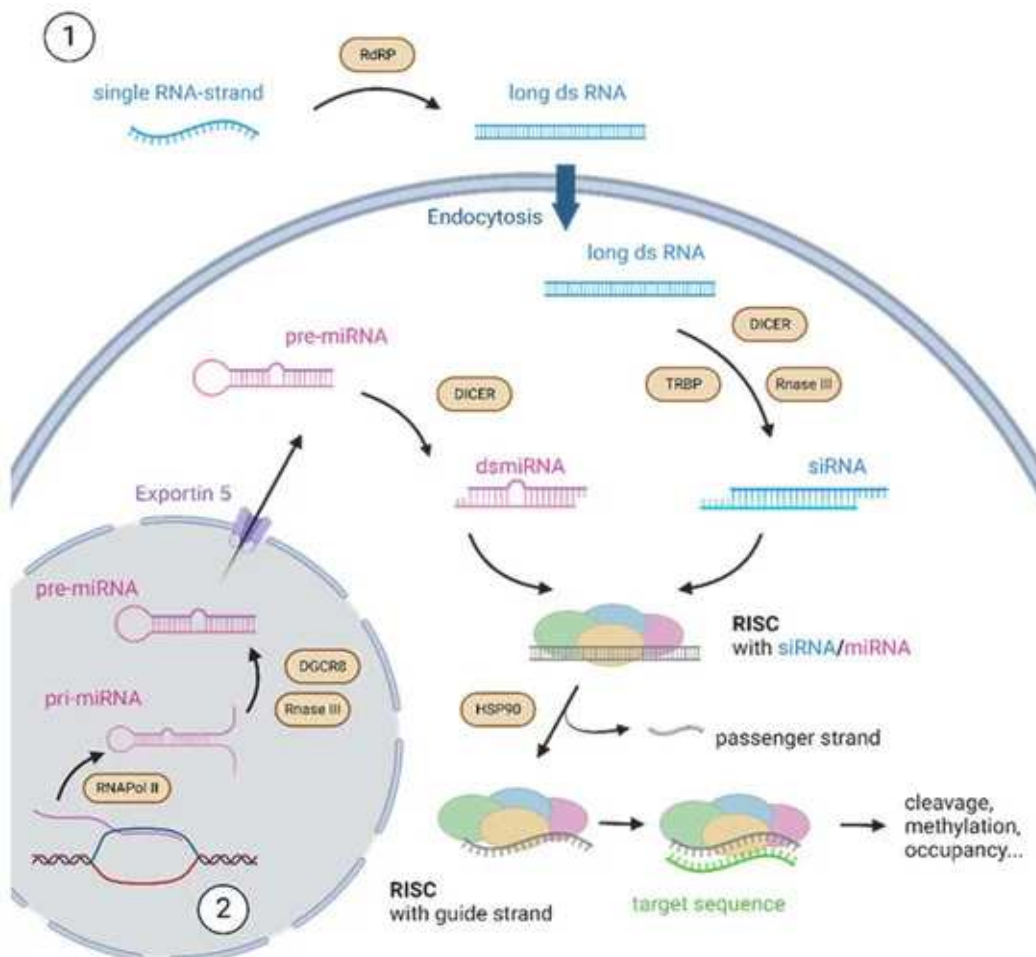
Questo complesso svolge un ruolo centrale nel processo di silenziamento mediante l'attività della famiglia proteica Argonaute.

Il complesso seleziona uno dei due filamenti del siRNA (colui che verrà definito il filamento "guida"), mentre degrada il rimanente filamento non selezionato (il filamento "passeggero").

3. **Silenziamento genico:** Una volta selezionato, il filamento "guida" dirige il complesso RISC verso le molecole di mRNA target che presentino una sequenza complementare.

Una volta individuato il bersaglio, la proteina Argonate ne altera l'espressione genica mediante scissione diretta dell'mRNA (cleavage), l'inibizione della traduzione dell'mRNA, o la metilazione del DNA.

Questo blocco porta inevitabilmente alla perdita della funzione del gene bersaglio garantendo l'efficacia del silenziamento.



**Figura 2.** Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione dell'RNA interference. L'immagine illustra il percorso dal dsRNA esogeno (via siRNA) e dei miRNA endogeni fino al silenziamento genico operato dal complesso RISC attraverso scissione (*cleavage*), metilazione o inibizione della traduzione (Isenmann, et al., 2023).

## **2.2 Vantaggi dell'impiego dell'RNAi e profilo di biosicurezza**

La comprensione dei complessi meccanismi molecolari alla base dell'RNAi rivela le potenzialità di questa tecnologia come alternativa ai metodi di difesa convenzionali basati sull'uso di prodotti fitosanitari, i quali, dopo decenni di uso intensivo, hanno visto l'emergere di criticità non più trascurabili, tra cui l'impatto sulla sicurezza alimentare-ambientale, e l'insorgenza di popolazioni di infestanti sempre più resistenti ai pesticidi di sintesi.

In questo scenario, l'RNAi si distingue dai suoi "predecessori", spesso caratterizzati da un ampio spettro d'azione e da una problematica persistenza ambientale, offrendo invece vantaggi che spaziano dalla specificità nucleotidica, all'elevato profilo di sicurezza alimentare, alla sostenibilità del profilo ecotossicologico garantito dalla rapidità di degradazione della molecola e dall'assenza di persistenza nell'ambiente.

### **2.2.1 Specificità d'azione e protezione degli organismi non-target**

Il primo e più significativo vantaggio risiede nella natura intrinseca del meccanismo, ovvero la sua elevata selettività.

Come già accennato, infatti, mentre i pesticidi tradizionali, ed in particolare dei fumiganti ampiamente utilizzati nell'industria molitoria, agiscono in modo indiscriminato su target biochimici comuni ad intere classi di organismi, l'RNAi si basa sulla complementarietà di sequenza nucleotidica, la quale varia drasticamente tra un organismo ed un altro. Sebbene molti esseri viventi condividano porzioni di genoma altamente conservate (geni orologi), la finestra di intervento richiesta dall'RNAi è talmente specifica e ristretta da permettere l'identificazione di sequenze uniche. È stato infatti dimostrato che una corrispondenza di appena 19-21 nucleotidi (nt) è sufficiente per innescare il processo di silenziamento genico (Chen e De Schutter, 2024).

Attraverso l'analisi bioinformatica, è dunque possibile selezionare target genici esclusivi, garantendo che il trattamento non interferisca con il genoma di organismi non-target, come insetti benefici, quali gli impollinatori, anche qualora questi presentino geni con funzioni biologiche analoghe (Fig. 4)

Proprio in virtù di questa specificità, la letteratura scientifica ha indagato a fondo la possibilità di effetti off-target e di risposte immunitarie aspecifiche, e sebbene studi recenti

abbiano analizzato queste possibilità (Lundgren e Duan, 2013) (come nel caso delle api), la letteratura concorda nel ritenere che un design bioinformatico accurato renda tali rischi estremamente improbabili, soprattutto se impiegati nelle reali condizioni di applicazione.

Infine c'è da porre l'attenzione sulla flessibilità che questa piattaforma biotecnologica offre, permettendo di contrastare efficacemente i possibili problemi d'insorgenza di resistenze.

Infatti qualora una popolazione di insetti dovesse sviluppare adattamenti contro una specifica sequenza, è teoricamente possibile riprogettare il dsRNA modificando il target genico.

Un processo decisamente più rapido ed economico rispetto allo sviluppo di un nuovo pesticida di sintesi.

## **2.2.2 Biodegradabilità ed assenza di residui persistenti**

Un secondo cruciale vantaggio, di particolare rilevanza per l'industria molitoria, riguarda il destino ambientale del dsRNA.

Mentre i fumiganti tradizionali come la fosfina sollevano preoccupazioni per la persistenza di residui tossici e il ritrovamento in tracce nelle matrici alimentari, il dsRNA, essendo una molecola biologica naturale, è caratterizzato da una labilità intrinseca.

Questa caratteristica infatti lo rende soggetto ad una rapida degradazione mediata da fattori quali i raggi UV, la temperatura e le nucleasi ambientali, che ne impediscono efficacemente l'accumulo.

A supporto di ciò, studi condotti su diverse tipologie di suolo (soprattutto limoso e argilloso) hanno dimostrato come venga degradato a livelli non rilevabili entro 24-36 ore dall'applicazione (7 giorni per ambienti acquosi).

Questa "instabilità ambientale", se da un lato rappresenta una sfida per la formulazione e per la somministrazione, dall'altro garantisce la massima sicurezza per il consumatore finale, poiché assicura che la molecola non persista nel prodotto (trasformato o meno), né che possa creare fenomeni di bioaccumulo lungo la filiera.

Inoltre proprio grazie a tale rapidità di degradazione e dall'assenza di residui persistenti, nel contesto specifico dei molini ed ambienti di stoccaggio delle farine, è possibile eliminare la necessità di complessi processi di aerazione necessari nell'uso di metodi di fumigazione tradizionali.

### **2.2.3 Barriere fisiologiche e sicurezza per la salute umana**

Oltre alla degradazione ambientale, la sicurezza dell'RNAi per l'uomo è garantita da formidabili barriere fisiologiche intrinseche al nostro apparato digerente.

A differenza di molti pesticidi sintetici, che possono essere assorbiti per via cutanea o inalatoria, infatti il dsRNA eventualmente ingerito, attraverso il consumo di prodotti alimentari venuti a contatto con esso, subirebbe un rapido processo di degradazione causato dall'ambiente estremamente acido dello stomaco ( $\text{pH} < 2$ ) e dalla presenza degli enzimi digestivi come ad esempio le ribonucleasi pancreatiche.

Tale profilo di sicurezza rende l'RNAi una delle tecnologie più promettenti nel campo della protezione delle derrate alimentari.

## **2.3 Limiti attuali e criticità nell'implementazione su larga scala**

Nonostante le elevate potenzialità dell'RNAi come strumento selettivo e sostenibile per il controllo degli insetti nocivi, il passaggio dalla sperimentazione in laboratorio all'applicazione industriale nel settore molitorio presenta ancora diverse criticità da valicare.

Tali ostacoli non riguardano esclusivamente la risposta biologica dell'insetto target, ma coinvolgono anche la stabilità della molecola negli ambienti di stoccaggio e la sostenibilità economica dei trattamenti trasposti su larga scala.

Di seguito verranno analizzati i principali limiti che attualmente condizionano l'efficacia e l'effettiva adozione di questa tecnologia in ambito industriale.

### **2.3.1 Barriere biochimiche e fisiologiche**

L'efficacia del silenziamento genico tramite RNAi non è uniforme tra le diverse specie di insetti e dipende strettamente dalla stabilità della molecola di dsRNA una volta raggiunto l'interno dell'organismo target.

Nel caso del *T. castaneum*, sebbene sia considerato l'organismo modello nel campo della ricerca, grazie alla sua elevata sensibilità all'RNAi, l'applicazione per via orale (ingestione) presenta criticità superiori rispetto all'iniezione sistemica.

Una volta ingerito, il dsRNA deve infatti sopravvivere ad un ambiente gastrico ostile, nel quale sono presenti ribonucleasi specifiche (dsRNAsi) (Cooper, et al., 2018). Il lume intestinale agisce come una vera e propria barriera biochimica, degradando i frammenti di RNA prima che quest'ultimi possano essere assorbiti dalle cellule epiteliali.

Diversi studi indicano come questo attacco vada a rallentare sensibilmente i tempi di risposta: se con l'iniezione il tempo necessario per portare alla mortalità si aggira sui 10 giorni, per quanto riguarda l'ingestione il tempo richiesto viene prolungato fino a 25 (Zhu, 2023).

Per ovviare a tale criticità, la ricerca si sta orientando verso l'impiego di sistemi di delivery avanzati, come l'incapsulamento in nanoparticelle lipidiche o polimeriche, le quali vanno a fungere da "scudo protettivo" contro la degradazione enzimatico-ambientale (Hernández-Soto e Chacón-Cerdas, 2021).

### **2.3.2 Sfide logistiche nell'ambiente molitorio**

L'efficacia dei trattamenti a base di dsRNA negli ambienti molitori deve confrontarsi con una realtà strutturale profondamente diversa dai campi aperti.

La sfida principale risiede nella natura non volatile della molecola, infatti se per quanto riguarda la fumigazione tradizionale ci si può affidare a gas capaci di penetrare passivamente in ogni fessura, nell'uso dell'RNAi si è limitati ad un'operazione per contatto, o più efficacemente, per ingestione.

Tuttavia, recenti sviluppi sulla tecnologia SIGS (Spray-Induced Gene Silencing) dimostrano come il dsRNA spruzzato su matrici post-raccolta mantenga una sorprendente stabilità, dovuta all'assenza di raggi UV ed alle condizioni controllate degli impianti (Chen, et al., 2025).

Questo limite impedisce però che la molecola possa essere semplicemente immessa nell'ambiente, ma impone invece di dover essere veicolata strategicamente dove l'infestazione è più attiva.

In tale scenario, la distribuzione uniforme all'interno di aziende con macchinari complessi e zone difficili da raggiungere, richiede l'integrazione di tecnologie di precisione.

Una via promettente è l'abbinamento del dsRNA a formulazioni adesive o a spray elettrostatici che permettano al principio attivo di ancorarsi alle superfici, aumentando le probabilità di contatto con l'insetto.

Parallelamente, l'adozione di sistemi "lure and kill", i quali fanno uso di attrattivi alimentari o feromonici per convogliare l'infestante verso stazioni di trattamento specifiche, potrebbe ridurre drasticamente lo spreco di formulato (El-Sayed, et al., 2009).

### **2.3.3 Sostenibilità economica e sviluppo su larga scala**

L'ultimo ostacolo che questa strategia di lotta agli insetti nocivi deve affrontare riguarda lo sviluppo a livello industriale.

La sintesi del dsRNA è infatti storicamente onerosa, ma attraverso recenti sviluppi nel campo della biosintesi, si è riuscito ad implementare l'utilizzo di microrganismi "ingegnerizzati" (per ora principalmente *Escherichia coli* o lieviti) come delle vere e proprie "bio-fabbriche", permettendo di produrre grandi quantità di dsRNA a costi molto più competitivi rispetto al passato (Perkin, et al., 2016).

Sebbene l'investimento iniziale superi quello dei pesticidi convenzionali, l'assenza di residui tossici e la possibilità di operare senza interrompere il ciclo produttivo (evitando i tempi di aerazione post-fumigazione) rendono la tecnologia economicamente sostenibile nel lungo periodo.

### **3. Caso Studio: *Tribolium castaneum***

In questo capitolo verrà analizzata l'applicazione della tecnologia dell'RNAi su *Tribolium castaneum*, identificato come modello biologico ideale per lo studio e la valutazione dell'efficacia del silenziamento genico negli insetti delle derrate.

Dopo un primo inquadramento biologico ed economico dell'infestante, verranno esaminati i motivi scientifici che rendono questo coleottero un organismo target d'elezione nella ricerca biotecnologica moderna.

#### **3.1 Inquadramento biologico e caratteristiche bio-morfologiche**

*Tribolium castaneum* (Fig.3), appartenente alla famiglia dei Tenebrionidae, è un coleottero cosmopolita considerato tra i più distruttivi per le derrate alimentari trasformate.

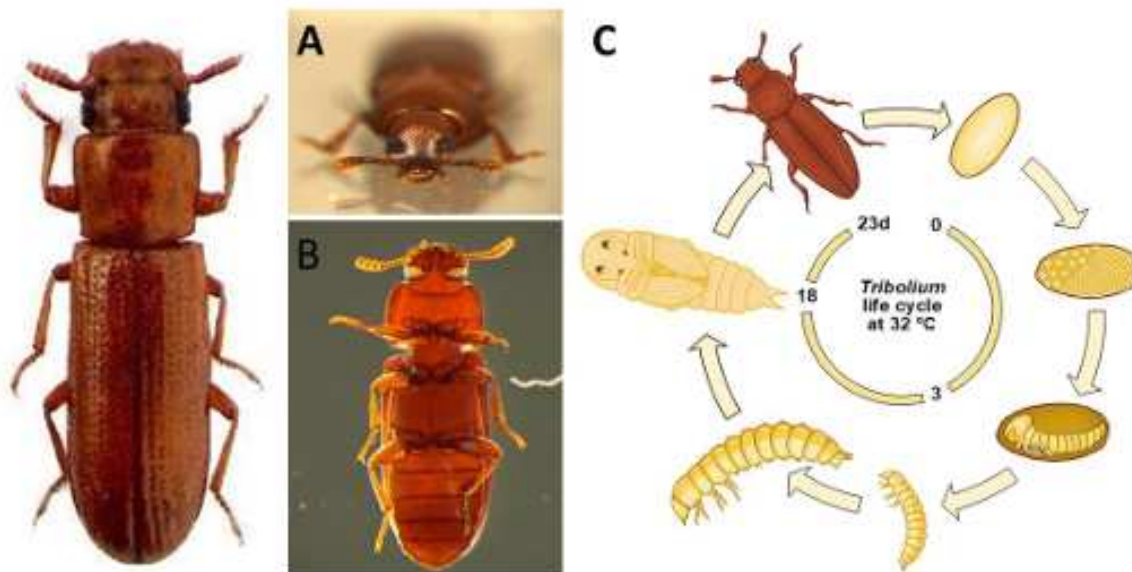
Caratterizzato da un corpo di piccole dimensioni (le dimensioni medie dell'adulto sono comprese tra i 3 e i 4 mm) tipicamente appiattito e di forma oblunga, presenta una colorazione che varia dal rosso-ruggine al marrone scuro, talvolta tendente al nero negli esemplari più maturi.

La forma depressa del corpo consente all'adulto di infiltrarsi agevolmente tra le giunzioni dei macchinari e nelle fessure più strette dei silos, rendendo la sua eradicazione meccanica estremamente complessa.

Tra le caratteristiche più rilevanti per la gestione delle infestazioni notiamo la notevole resilienza, capace di adattarsi a temperature elevate e ambienti con scarsa disponibilità idrica, condizioni tipiche dei siti di stoccaggio e lavorazione delle granaglie, e l'altrettanto straordinaria longevità degli adulti, che in condizioni ambientali favorevoli possono raggiungere un'aspettativa di vita di circa 3 anni. Durante questo periodo il potenziale riproduttivo delle femmine è altissimo, infatti una singola femmina può arrivare a deporre un numero di uova stimato tra le 900 e le 1000, garantendo una crescita esponenziale della popolazione in tempi rapidissimi.

Il ciclo vitale è di tipo olometabolo (uovo, larva, pupa, adulto) e la sua velocità è strettamente dipendente dalle condizioni ambientali. In condizioni ottimali (30°C e 70% di umidità relativa), l'intero sviluppo da uovo ad adulto si completa in circa 3-4 settimane.

<b>Parametro</b>	<b>Descrizione / Valore</b>	<b>Note Biologiche</b>
<b>Ordine / Famiglia</b>	Coleoptera / Tenebrionidae	
<b>Dimensioni adulto</b>	3 – 4 mm	Appiattito e di forma oblunga
<b>Colorazione</b>	Rosso-ruggine, bruno-rossastro	
<b>Longevità adulto</b>	Fino a 3 anni	Notevole resilienza idro-termica
<b>Potenziale riproduttivo</b>	900 – 1000 uova per femmina	All'interno dell'intero ciclo vitale
<b>Incubazione uova</b>	9 – 12 giorni	Deposizione in fessure o direttamente nel substrato
<b>Sviluppo larvale</b>	~ 15 giorni	Stadio di massima attività trofica
<b>Fase di pupa</b>	~ 5 giorni	Fase di metamorfosi protetta da cuticola; assenza di nutrizione
<b>Fase Adulta</b>	Fino a 3 anni	Elevata longevità e mobilità



**Figura 3.** Rappresentazione del *Tribolium castaneum* da diverse prospettive, e ciclo vitale dello stesso (Zhu, 2023)

### 3.2 Degradazione delle derrate e impatto economico sulla filiera

A differenza di altri infestanti, definiti “primari”, che attaccano la cariosside integra, il *T. castaneum* è un infestante secondario.

Questa tipologia predilige cibarsi di cereali già danneggiati o di prodotti derivanti dalla lavorazione industriale, quali sfarinati, crusche ed altri sottoprodotti della macinazione.

Queste premesse rendono gli impianti molitori l’habitat ideale per il suo sviluppo e proliferazione, concentrando il danno nelle fasi cruciali della trasformazione alimentare.

L’impatto di questo coleottero sulle derrate alimentari si manifesta attraverso una combinazione di danni diretti ed indiretti che ne compromettono gravemente la commerciabilità.

#### **Danno diretto:**

Il danno diretto è principalmente riconducibile all’attività trofica, che si manifesta con maggior intensità durante lo stadio larvale.

È infatti stato stimato che, durante il suo sviluppo, una singola larva sia in grado di consumare fino a 13 mg di sfarinato (Zhu, 2023).

Oltre a questo, un altro danno diretto è caratterizzato dalla penetrazione negli imballaggi, infatti pur non essendo un abile perforatore attivo di questi ultimi, in fase adulta, grazie alla

sua morfologia appiattita, riesce a sfruttare micro-fessure del packaging per raggiungere il prodotto al suo interno (Zhu, 2023).

### **Danno Indiretto:**

Per quanto invece riguarda il danno indiretto, rappresentante la minaccia più subdola, possiamo suddividerlo in 3 macro-categorie:

- 1. Contaminazione fisica e microbiologica:** L'accumulo di esuvie (resti delle mute larvali), secrezioni filamentose e carcasse all'interno degli sfarinati non rappresenta solo un danno estetico, ma va ad impattare profondamente anche sul lato igienico-sanitario.  
L'attività metabolica dell'insetto e l'aggregazione di individui vanno infatti ad incrementare il tasso di umidità e temperatura dei cereali, favorendo lo sviluppo di microflora fungina che, oltre a degradare il prodotto, può portare alla sintesi di aflatossine, sostanze altamente cancerogene che rendono il prodotto pericoloso per la salute umana e ne impongono lo smaltimento obbligatorio (Duarte, et al. 2021) (EFSA, 2020).
- 2. Contaminazione chimica:** La caratteristica più critica del *T. castaneum* è la secrezione, mediante ghiandole odorifere, di composti difensivi noti come benzochinoni (Villaverde, et al., 2007).  
Queste sostanze, oltre a conferire alle farine un odore pungente e acre, alterano le proprietà reologiche delle stesse, conferendo loro una colorazione rosata o bruna e rendendole totalmente invendibili per il consumo umano, anche in presenza di infestazioni numericamente ridotte.
- 3. Resistenza ai trattamenti e costi gestionali:** Infine, un ulteriore danno indiretto è l'onere economico legato alla crescente resistenza farmacologica che questa specie ha sviluppato verso i fumiganti e gli insetticidi di sintesi tradizionali (quali la fumigazione con fosfina).  
Questo fenomeno costringe le aziende a ricorrere a protocolli di disinfestazione "straordinari", che includono cicli di pulizia meccanica più frequenti, fermi macchina prolungati e l'impiego di tecnologie costose (come il trattamento con calore o atmosfere controllate), gravando pesantemente sui margini di profitto della filiera (Rajendran, 2020).

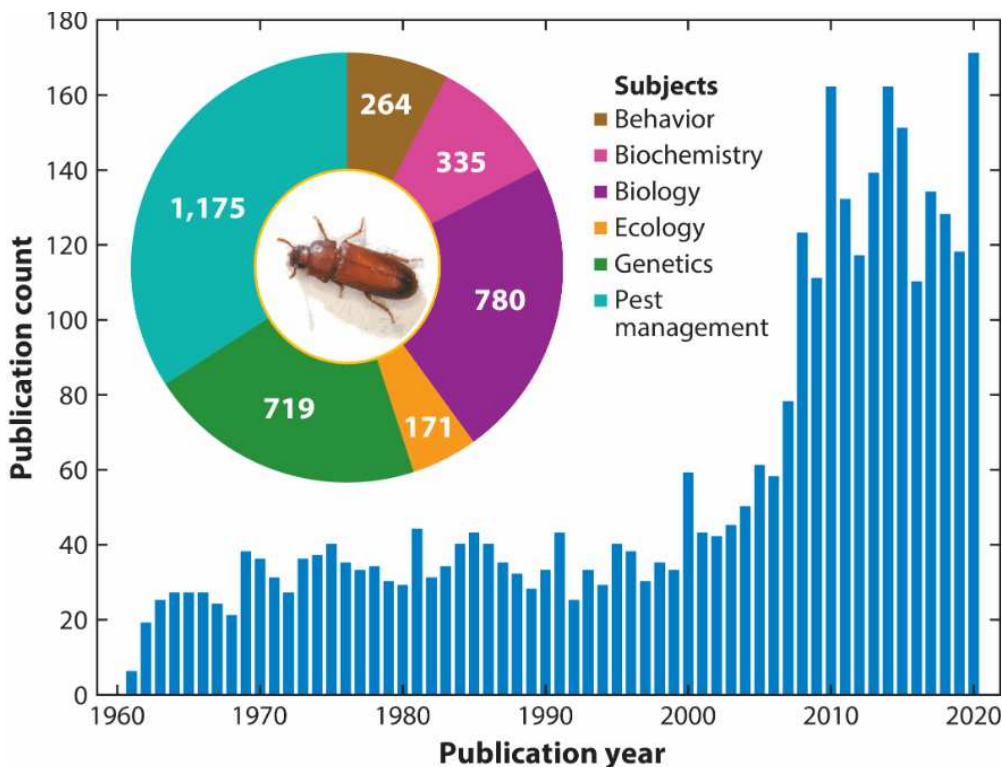
### 3.3 Sensibilità del modello al silenziamento genico tramite RNAi

Il *T. castaneum* non rappresenta solo un temibile infestante, ma è considerato a livello globale uno degli organismi modello più preziosi per lo studio della genetica funzionale.

L'importanza scientifica di questa specie è testimoniata dalla crescita esponenziale delle pubblicazioni negli ultimi decenni, che spaziano dalla biologia fondamentale alla gestione dei parassiti (Campbell, et al., 2022) (Fig.4).

La ragione principale di questo primato risiede nella sua straordinaria sensibilità all'RNA interference (RNAi), una caratteristica che lo distingue nettamente da altri ordini di insetti, come ad esempio i Lepidotteri, spesso recalcitranti a tale tecnologia, con risposte deboli o incostanti (Koo e Palli, 2024).

Al contrario questo coleottero possiede un macchinario molecolare estremamente efficiente che garantisce un silenziamento genico robusto e persistente.



**Figura 4.** Diagramma della pubblicazione scientifiche sul *Tribolium castaneum* nel periodo 1950-2020 (Campbell, et al., 2022).

### 3.3.1 Caratteristiche molecolari e meccanismi di risposta

La straordinaria ricettività del *Tribolium* risiede in una combinazione di fattori biologici che permettono alla molecola di dsRNA di agire con efficacia sull'intero organismo.

In particolare, si distinguono due proprietà fondamentali:

- **RNAi Sistemico:** Una volta introdotto (per iniezione o ingestione), il segnale di silenziamento non rimane confinato al sito di assorbimento iniziale, come l'intestino, ma viene veicolato attivamente attraverso l'emolinfa a tutti i tessuti dell'organismo. Il segnale viene infatti trasportato attivamente nelle cellule grazie a complessi proteici altamente funzionali, permettendo così di colpire target vitali in organi distanti, quali il sistema nervoso, muscolare e riproduttivo.
- **RNAi Parentale (pRNAi):** Questa specie presenta una caratteristica peculiare, ovvero una risposta parentale estremamente efficiente, ciò consente, mediante l'esposizione di femmine al dsRNA, di trasmettere l'effetto di silenziamento direttamente alla progenie, permettendo di abbattere geni essenziali per l'embriogenesi e neutralizzando la generazione successiva prima ancora della schiusa delle uova.

A favorire questi processi interviene anche la ridotta attività delle nucleasi, la quale a differenza di specie "recalcitranti" che degradano l'RNA esogeno, permette nel *Tribolium* che il dsRNA rimanga integro e funzionale per tempi prolungati, garantendo un effetto duraturo anche con dosaggi contenuti.

### 3.3.2 Validazione sperimentale e identificazione di target letali

La robustezza di questo modello biologico ha permesso l'esecuzione di screening genomici su larga scala che hanno trasformato le conoscenze teoriche in evidenze applicative.

Studi sistemici condotti su oltre 5.000 geni target hanno permesso di identificare circa 100 geni chiave la cui inibizione può indurre tassi di mortalità superiori al 90% negli stadi larvali e pupali (Schmitt-Engel, et al., 2015).

Tali risultati confermano la possibilità di selezionare target con un'altissima precisione fenotipica, consentendo di bloccare processi vitali specifici, come la sintesi della chitina

durante la muta, andando di fatto ad impedirla, o il metabolismo energetico cellulare, provocando la rapida morte della larva.

Questa combinazione di alta sensibilità e disponibilità di target letali rende il *T. castaneum* il candidato ideale per il controllo delle popolazioni tramite l'uso dell'RNAi (Campbell, et al., 2022).

Inoltre, poiché l'insetto risponde con estrema efficacia all'ingestione di dsRNA, è possibile ipotizzare l'integrazione di queste molecole direttamente nelle matrici alimentari o in esche specifiche all'interno degli impianti molitori e di stoccaggio.

Tale approccio potrebbe rappresentare una soluzione sostenibile per superare le resistenze ai fumiganti tradizionali e agli insetticidi di sintesi.

Infatti colpendo esclusivamente geni sequenza-specifici, si otterrebbe un controllo mirato della filiera, minimizzando al contempo l'impatto ambientale e i rischi tossicologici per l'operatore e il consumatore finale.

## 4. Conclusioni e prospettive future

L'analisi condotta in questo elaborato evidenzia come il *T. castaneum* rappresenti non solo una sfida critica per la sicurezza alimentare globale, ma anche il modello ideale per l'applicazione delle moderne biotecnologie di controllo.

La transizione verso una gestione degli infestanti basata sull'RNA interference (RNAi) segna perciò un cambio di rotta: il passaggio da una difesa chimica aspecifica ad una protezione molecolare di precisione, capace di colpire selettivamente l'organismo target senza interferire con la biosicurezza dell'ambiente e della filiera.

Tuttavia, affinché l'efficacia dimostrata in ambito sperimentale si traduca in un'applicazione industriale reale, è necessario superare alcune sfide cruciali, tecnologiche e conoscitive.

Il primo limite riguarda la sostenibilità economica: il passaggio dalla produzione sintetica del dsRNA a sistemi di produzione in vivo tramite fermentazione batterica è essenziale per abbattere i costi di produzione per renderli competitivi con i metodi tradizionali, e rendere la tecnologia applicabile su larga scala.

In secondo luogo, la stabilità della molecola all'interno di ambienti fisiologici complessi come magazzini e mulini rappresenta un altro fattore limitante.

La degradazione causata dalle nucleasi (dsRNasi) e le variazioni di pH nel tratto digerente dell'insetto possono infatti compromettere l'efficienza del silenziamento, e per ovviare a ciò, sarà fondamentale perfezionare e scalare a livello industriale l'impiego di sistemi di delivery avanzati già oggetto di studio, come l'incapsulamento in nanomateriali o vescicole lipidiche.

Questi sistemi non dovranno solo facilitare l'assorbimento cellulare, ma garantire un profilo di stabilità e costi compatibile con le dinamiche della grande distribuzione alimentare.

In conclusione, l'integrazione dell'RNAi nelle strategie di Integrated Pest Management (IPM) si prospetta come la soluzione più efficace e sostenibile alle crescenti resistenze farmacologiche, riducendo drasticamente l'impatto tossicologico dei trattamenti tradizionali.

Il successo di questa tecnologia, che già si pone come la candidata più promettente per sostituire i trattamenti chimici convenzionali, dipenderà dalla capacità di far collaborare diverse discipline, dalla genomica all'ingegneria dei materiali, in modo da riuscire a garantire una filiera cerealicola che sappia coniugare l'efficienza produttiva con i più alti standard di sicurezza per l'operatore e il consumatore finale.

## Bibliografia

- A. M. El-Sayed, D. M. Suckling, J. A. Byers, E. B. Jang, C. H. Wearing, Potential of “Lure and Kill” in Long-Term Pest Management and Eradication of Invasive Species, *Journal of Economic Entomology*, Volume 102, Issue 3, 1 June 2009, Pages 815–835, doi.org/10.1603/029.102.0301
- Cooper, A.M., Silver, K., Zhang, J., Park, Y. and Zhu, K.Y. (2019), Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest. Manag. Sci.*, 75: 18-28. doi.org/10.1002/ps.5126
- Chen, Y. and De Schutter, K. (2024), Biosafety aspects of RNAi-based pests control. *Pest Manag Sci*, 80: 3697-3706. doi.org/10.1002/ps.8098
- Duarte, S.; Magro, A.; Tomás, J.; Hilário, C.; Alvito, P.; Ferreira, R.B.; Carvalho, M.O. The Interaction between *Tribolium castaneum* and Mycotoxigenic *Aspergillus flavus* in Maize Flour. *Insects* 2021, 12, 730. doi.org/10.3390/insects12080730
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom LR, Leblanc J-C, Nebbia CS, Nielsen E, Ntzani E, Petersen A, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Marko D, Oswald IP, Piersma A, Routledge M, Schlatter J, Baert K, Gergelova P and Wallace H, 2020. Scientific opinion – Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal* 2020;18(3):6040, 112 pp. doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040
- European Commission. (2020). Farm to Fork Strategy: For a fair, healthy and environmentally-friendly food system. Food Safety
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811 (1998). doi.org/10.1038/35888
- Gerken AR and Morrison WR III (2022) Pest Management in the Postharvest Agricultural Supply Chain Under Climate Change. *Front. Agron.* 4:918845. doi: 10.3389/fagro.2022.918845
- Hernández-Soto, A.; Chacón-Cerdas, R. RNAi Crop Protection Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12148. doi.org/10.3390/ijms222212148
- Isenmann, M.; Stoddart, M.J.; Schmelzeisen, R.; Gross, C.; Della Bella, E.; Rothweiler, R.M. Basic Principles of RNA Interference: Nucleic Acid Types and In Vitro Intracellular Delivery Methods. *Micromachines* 2023, 14, 1321. doi.org/10.3390/mi14071321
- James F. Campbell, Christos G. Athanassiou, David W. Hagstrum, Kun Yan Zhu. 2022. *Tribolium castaneum*: A Model Insect for Fundamental and Applied Research. *Annual Review Entomology*. 67:347-365. doi.org/10.1146/annurev-ento-080921-075157
- Jonathan G. Lundgren, Jian J. Duan, RNAi-Based Insecticidal Crops: Potential Effects on Nontarget Species, *BioScience*, 63(8), 657–665, doi.org/10.1525/bio.2013.63.8.8
- Jürgen Dönitz, Christian Schmitt-Engel, Daniela Grossmann, Lizzy Gerischer, Maike Tech, Michael Schoppmeier, Martin Klingler, Gregor Bucher, iBeetle-Base: a database for RNAi phenotypes in the red flour beetle *Tribolium castaneum*, *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D720–D725

- Koo, J. & Palli, S.R. (2025) Recent advances in understanding of the mechanisms of RNA interference in insects. *Insect Molecular Biology*, 34(4), 491–504. Available from: doi.org/10.1111/imb.12941
- Perkin, L.C.; Adrianos, S.L.; Oppert, B. Gene Disruption Technologies Have the Potential to Transform Stored Product Insect Pest Control. *Insects* 2016, 7, 46. doi.org/10.3390/insects7030046
- Rajendran, Somiahnadar (2020). Insect Pest Management in Stored Products. In: *Encyclopedia of Quality Life and Sustainability*, 31(1)
- Schmitt-Engel, C., Schultheis, D., Schwirz, J. *et al.* The iBeetle large-scale RNAi screen reveals gene functions for insect development and physiology. *Nat Commun* 6, 7822 (2015). doi.org/10.1038/ncomms8822
- Torri A, Jaeger J, Pradeu T, Saleh M-C (2022) The origin of RNA interference: Adaptive or neutral evolution? *PLoS Biol* 20(6): e3001715. doi.org/10.1371/journal.pbio.3001715
- Villaverde, M. L., Juárez, M. P., & Mijailovsky, S. (2007). Detection of *Tribolium castaneum* (Herbst) volatile defensive secretions by solid phase microextraction–capillary gas chromatography (SPME-CGC). *Journal of Stored Products Research*, 43(4), 540-545. doi.org/10.1016/j.jspr.2007.03.003
- Wang XH, Aliyari R, Li WX, Li HW, Kim K, Carthew R, Atkinson P, Ding SW. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*. 2006 Apr 21;312(5772):452-4. doi: 10.1126/science.1125694
- Wei Chen, Honglei Xu, Mengjiao Chen, Peian Tang, and Kangxu Wang  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2025 73 (18), 10778-10786  
DOI: 10.1021/acs.jafc.4c13212
- Zhu, X. (2023). *Exploring RNAi Technology for Management of Stored Grain Beetle: Tribolium castaneum*. [Tesi di Dottorato, Murdoch University]. Murdoch University Research Repository. researchrepository.murdoch.edu.au/

## **Ringraziamenti**

Chi sa, sa.