

# Biologia molecolare per scrivere la carta di identità genetica delle principali varietà di riso

**Francesca De Vecchi**

Esperta in Scienze e tecnologie alimentari

Il riso, *Oryza sativa*, è una pianta erbacea della famiglia delle Graminacee, di origine probabilmente cinese già usato come alimento nel VI secolo AC. Fu Alessandro Magno a portarlo in Europa, attraverso la conquista dell'India. Gli Arabi poi contribuirono alla sua diffusione e coltivazione nel bacino mediterraneo: dalla Spagna, al Regno di Napoli arrivò anche in Piemonte e in Lombardia. Qui Leonardo da Vinci convinse Ludovico il Moro, signore di Milano verso la fine del 1400, che regimentando le

acque in Lomellina si sarebbe potuto coltivare con successo. Si avviò così lo sviluppo della risicoltura in Italia, proprio nella provincia di Pavia, ancora oggi la prima provincia risicola a livello europeo. Fu, molto più tardi, Camillo Benso conte di Cavour a capire le grandi potenzialità della coltivazione, nella gestione delle carestie. Nel 1860 terminò la costruzione di un canale che lo stesso Cavour, come Ministro dell'agricoltura, aveva voluto: collegando il Po, la Dora Baltea, il Sesia, il Ticino e il Lago Maggiore

nacque una rete di irrigazione di 400.000 ettari, ancora oggi il cuore della risicoltura nazionale e non solo. L'Italia è il primo produttore di riso in Europa, con 1,5 milioni di tonnellate divise fra le varietà Japonica e le varietà Indica, su un totale europeo di 1,7 milioni di tonnellate, cui contribuiscono anche Spagna, Portogallo, Grecia, Francia, Romania, Bulgaria e Ungheria.

## Merceologia e analisi sensoriale

La classificazione merceologica del riso dipende dalla dimensione del granello (Reg. Ue 1308/2013): in base a lunghezza e larghezza si classificano le varietà a grani tondi, grani medi, grani lunghi A e grani lunghi B (queste ultime due comprendono anche le varietà di Indica).

In Italia sono iscritte nel Registro Nazionale Risi 180 varietà di riso. Istituito nel 1971, il Registro raccoglie le varietà che possono essere commercializzate secondo le regole stabilite nella Legge del Mercato Interno (DM 1 ottobre 2015) che prevede una

## Ente Nazionale Risi

L'Ente Nazionale Risi è un ente pubblico economico sottoposto alla vigilanza del Ministero delle Politiche agricole alimentari e forestali, che fornisce assistenza tecnica e analitica agli agricoltori e ai produttori, controlla la commercializzazione del riso italiano ed è organismo pagatore degli aiuti e interventi comunitari dell'Ue.

Il suo Centro di ricerca opera nei settori del miglioramento genetico e della selezione e adattamento varietale, dell'agronomia, fitopatologia ed entomologia, nonché della biochimica, fisiologia e merceologia analitica, con lo scopo di perseguire la massima produttività, il perfezionamento delle pratiche colturali e il miglioramento delle caratteristiche qualitative del riso.

## I numeri del riso

La produzione mondiale di riso si aggira intorno a 470 milioni di tonnellate coltivate su un'area pari a 5 volte la superficie italiana. I Paesi maggiori produttori sono quelli da cui tutto è nato: Cina e India, che da sole contribuiscono con il 60%. Seguono poi Indonesia, Bangladesh, Thailandia, Giappone, Birmania, Filippine, Brasile, Corea, Stati Uniti, Giappone e Pakistan, sebbene con rese in campo molto diverse, che possono fare la differenza: la Cambogia ha una resa per ettaro pari 15 quintali, contro gli 80 dell'Australia.

Sono 5.000 le varietà conosciute e coltivate, per lo più di stirpe Indica caratterizzata da granelli lunghi, affusolati e vitrei. L'Italia coltiva 140 varietà (sia Japonica, quella adatta per risotti, sia Indica) su una superficie di 234.300 ettari (dati 2016), che rappresenta il 52% della superficie europea. Un terzo della produzione nazionale rimane nel Paese, il resto è destinato all'esportazione nel mondo, dove il nostro riso è sempre più apprezzato.

Poco più di 4.200 aziende risicole alimentano un settore da circa 500 milioni di euro. Le industrie risiere sono circa 100, ma 6 detengono nell'insieme più del 50% del mercato. Il riso lavorato rappresenta in Italia un giro di affari di circa 1 miliardo di euro, con consumi che, dopo essere rimasti stabili per circa 20 anni, hanno ripreso a crescere, grazie anche all'affermarsi delle lavorazioni "parboiled" (da risotto e da insalata) che stanno conquistando anche le regioni del Centro e Sud Italia, meno legate alla tradizione gastronomica risiera tipica lombarda, piemontese e veneta.

Ecco perché è l'Italia il Paese che sta guidando una missione che chiede all'Unione europea di difendere la filiera dalla concorrenza delle importazioni asiatiche, che per l'assenza di dazi ha dimezzato in un anno la produzione di Indica italiana, attiva dal 1990 e molto apprezzata. Il pericolo è, infatti, rappresentato dalle importazioni a dazio zero da Cambogia e

Myanmar, frutto di una liberalizzazione stabilita nel 2009 per l'import dai Paesi in via di sviluppo (Pma, Paesi meno avanzati) (Tabella).

Nonostante una lieve diminuzione dei volumi importati per la campagna 2016/1017 (-9%), spiega **Roberto Magnaghi**, responsabile del Centro di Ricerca dell'Ente Risi dalle pagine del notiziario dell'Ente (gennaio 2017), e una richiesta da parte dell'Unione al governo Cambogiano di stabilizzare i volumi di esportazione verso l'Europa, la situazione mantiene in allerta il settore.

L'incremento delle importazioni dai Pma ha già provocato una destabilizzazione di tutto il mercato, spiega ancora

Importazioni nella UE dai PMA per origine								
Paese	08/09	09/10	10/11	11/12	12/13	13/14	14/15	15/16
Cambogia	6.012	28.617	98.986	108.784	195.544	254.667	279.302	336.426
Myanmar	0	0	0	35.938	16.420	139.969	227.514	168.517
Altri	4.268	2.940	2.362	2.321	3.972	5997	6.446	6.705
<b>Totale</b>	<b>10.280</b>	<b>31.557</b>	<b>101.348</b>	<b>147.044</b>	<b>215.936</b>	<b>400.633</b>	<b>513.262</b>	<b>511.648</b>

\* Dati espressi in tonnellate di riso e rotture di riso tal quale

*Nella campagna 2015/2016 le importazioni dalla Cambogia sono aumentate del 20,4% rispetto alla campagna precedente, mentre le importazioni dal Myanmar sono calate del 26%*

Magnaghi, non solo per i volumi di esportazione persi della varietà Indica, ma anche perché si sta assistendo ad uno spostamento, per il terzo anno consecutivo, degli investimenti in superficie dal riso di tipo Indica (Lungo B) al riso di tipo Japonica (Tondo, Medio e Lungo A), anche se questa volta lo spostamento è risultato abbastanza contenuto (1.481 ha). Dopo il fallimento della delegazione europea in Cambogia nel luglio 2016, a fine febbraio 2017 si riunirà a Milano una delegazione dei Paesi europei produttori di riso, organizzata dall'Ente Nazionale Risi, per creare un fronte comune nel confronto con Ue. La posizione italiana, si legge in un comunicato di Enr, sarà quella di chiedere l'immediato ripristino dei dazi alle importazioni di riso da Cambogia e Myanmar, aboliti nel 2009.

suddivisione merceologica ulteriore: Comune o Originario, Semifino, Fino e Superfino, in ordine decrescente di dimensione del chicco e di resistenza alla cottura. Le altre caratteristiche che concorrono a definire l'ampio concetto di qualità del riso

comprendono il tempo di gelatinizzazione, che permette una correlazione coi tempi di cottura, il contenuto di amiloso e le analisi di consistenza e collosità. Fra queste sta assumendo una sempre maggiore rilevanza la presenza di aromaticità, spiega

**Mauro Cormegna**, del Laboratorio chimico-merceologico del centro di ricerche dell'Ente Nazionale Risi (Enr).

La caratterizzazione sensoriale del riso, effettuata tramite analisi chimiche

(Continua a pagina 15)

## Varietà resistenti e migliore qualità: la biologia molecolare applicata al riso

**Lætitia Borgo** è responsabile del Laboratorio di Biologia molecolare del Centro di Ricerca dell'Enr. Le abbiamo chiesto di illustrare le potenzialità delle tecniche di biologia molecolare per lo studio delle caratteristiche del riso che presentano un forte impatto commerciale.

### Come si applicano le tecniche di biologia molecolare alle analisi su riso?

La biologia molecolare è un ramo della biologia che studia e interpreta a livello molecolare i fenomeni biologici, considerando la struttura, le proprietà e le reazioni delle molecole chimiche di cui gli organismi viventi sono costituiti. Comprende le tecniche che consentono la rilevazione, l'analisi, la manipolazione, l'amplificazione (PCR) e la copia (clonaggio) degli acidi nucleici. All'Enr usiamo tecniche basate sullo studio del Dna mediante la PCR per caratterizzare il materiale genetico o effettuare l'identificazione varietale con la tecnica del *fingerprinting* del Dna. Effettuiamo anche Selezione assistita da marcatori molecolari (Sam), che accelera e semplifica la selezione delle migliori caratteristiche delle piante attraverso incroci ripetuti. All'Enr, viene applicata nei programmi di *breeding* finalizzati alla costituzione di varietà resistenti a *Pyricularia grisea*, di varietà aromatiche oppure di varietà che hanno una determinata quantità di amilosio nel granello. Infine, le applichiamo per accertare l'assenza di eventuali contaminazioni Ogm in riso. L'analisi Ogm è stata messa a punto nel 2006 per proteggere la filiera risicola italiana in quanto un evento riso Ogm LLrice601, non-autorizzato nell'Ue e nemmeno autorizzato per la coltivazione ed il consumo negli Stati Uniti, è stato trovato in alcune importazioni di riso a granello lungo provenienti dall'America. L'Enr, in aggiunta ai numerosi controlli qualitativi che effettua sulle partite delle proprie sementi, ha deciso di effettuare un ulteriore controllo al fine di accertare l'assenza di contaminazione Ogm nelle proprie sementi.

### Quali sono le malattie fungine più comuni?

Nel riso, le malattie fungine più frequenti sono l'elmintosporiosi, la fusariosi, il marciume del colletto e dello stelo, il falso carbone e il brusone; quest'ultima è una delle più gravi patologie del riso a distribuzione mondiale, causata dal fungo ascomicete *Pyricularia grisea*.

Il brusone, infatti, può manifestarsi in ogni stadio dello sviluppo della pianta, acquistando in Italia maggiore intensità sui soggetti adulti.

Il "mal del collo" è la patologia che causa i danni maggiori per quanto riguarda il raccolto: la parte interessata dalla lesione è quella compresa tra la foglia bandiera e l'inizio della pannocchia. Il patogeno, oltre a distruggere le cellule dei tessuti interessati, impedisce il trasporto di sostanze nutritive alle pannocchie occludendo col proprio micelio i fasci vascolari. In caso di attacco tardivo la pianta produrrà cariossidi vuote o malformate, mentre se l'infezione è precoce non produrrà cariossidi.

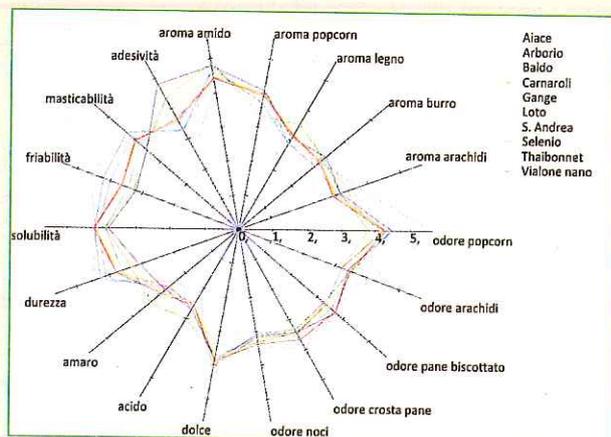


Figura 1 - Profilo sensoriale del riso coltivato in diverse località (A.A. 2011). (Analisi chimico-merceologiche e sensoriali su riso. Caratterizzazioni a confronto su varietà italiane. Gallassi L, Simonelli C, Cormegna M, Bianchi P. ERSAP - Laboratorio di Analisi Sensoriale; Enr - Laboratorio chimico merceologico (LCM) - Centro ricerche sul riso)

### Come selezionate le varietà più resistenti?

L'Enr ha deciso di focalizzare l'attenzione, mediante la Sam, sulla costituzione di varietà resistenti al brusone, in quanto la malattia causata da *Pyricularia grisea* induce elevate perdite di produzione (Figura 3). I geni di resistenza a *Pyricularia grisea*, chiamati geni Pi, codificano per proteine implicate nel riconoscimento dei patogeni e nell'attivazione di sistemi di difesa in pianta. Almeno 80 geni che conferiscono resistenza a ceppi specifici di *Pyricularia grisea* sono stati descritti nel germoplasma di riso.

Presso il nostro Laboratorio sono stati messi a punto dei protocolli per rilevare la presenza dei geni di resistenza Pi-ta, Pi-b, Pi-z e Pi-kh con la finalità di effettuare la Sam. I marcatori molecolari fiancheggiati e/o strettamente associati ai geni di resistenza permettono lo screening per rilevare la presenza



Lætitia Borgo, responsabile del Laboratorio di Biologia molecolare del Centro ricerca dell'Enr

dei geni di resistenza a *Pyricularia grisea* in diverse accessioni (materiale genetico a scopo di conservazione e ricerca) della Banca del Germoplasma, la collezione di risorse genetiche dell'Ente Nazionale Risi. La caratterizzazione di queste accessioni ha permesso di definire programmi di breeding mirati, finalizzati alla costituzione di varietà che possiedono uno o più geni di resistenza a *Pyricularia grisea* mediante "gene pyramiding" (Figura 2), il processo di combinazione simultanea di più geni in un singolo genotipo. In effetti, l'inserimento, mediante incroci, di uno o più geni

Pi consente l'ottenimento di varietà con resistenza ad ampio spettro al patogeno, evitando i trattamenti fungicidi. La Selezione assistita con i marcatori molecolari ha permesso ad Ente Nazionale Risi di costituire le varietà Libero nel 2006, CL26 e CL71 nel

(Continua a pagina 14)

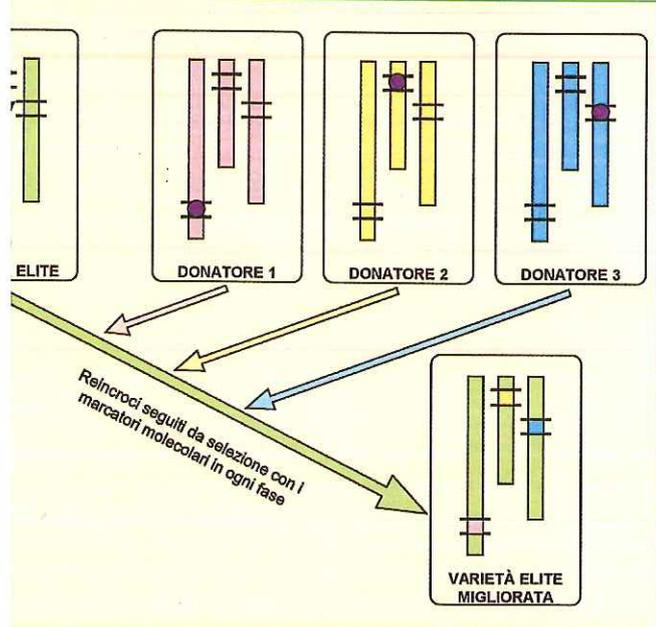


Figura 2 - Gene Pyramiding (Lætitia Borgo, 2015)

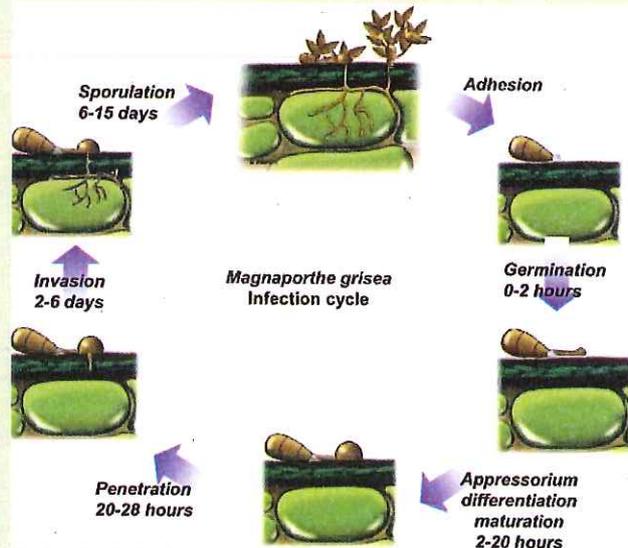


Figura 3 - Il ciclo della *Pyricularia*. Le varietà di riso presentano un diverso grado di resistenza al brusone e possono quindi essere distinte in varietà geneticamente resistenti e varietà suscettibili all'invasione del fungo

2011, CL12, CL46 e CL80 nel 2012, CL15 nel 2015, CL28 e CL33 nel 2017 che possiedono il gene di resistenza Pi-kh e la varietà CL31 nel 2016 che possiede i geni di resistenza Pi-kh e Pi-ta.

### Quali caratteristiche di una data varietà si possono studiare con le tecniche di biologia molecolare?

Le tecniche di biologia molecolare basate sullo studio del Dna mediante analisi PCR permettono di caratterizzare una determinata varietà mediante l'analisi del gene associato al carattere di interesse, per esempio la presenza di aroma e la composizione in amilosio/amilopeptina.

### Può farmi qualche esempio di studi che avete condotto in merito?

Per quanto riguarda la caratterizzazione dell'aroma, le varietà di riso aromatiche possiedono un granello che emana un particolare profumo, comparabile a quello del pop-corn per i consumatori occidentali e a quello della pianta del Pandano (*Pandanus amaryllifolius*) per i consumatori orientali. La 2-acetil-1-pirrolina (2AP) è una delle molecole aromatiche responsabile dell'aroma del riso ed è prodotta da tutti i genotipi di riso. L'enzima Betaina Aldeide Deidrogenasi (BAD2) è coinvolto nel metabolismo della 2-acetil-1-pirrolina in quanto è in grado di degradare quest'ultima. Nelle varietà aromatiche, il gene recessivo che codifica per la BAD2 presenta una delezione di 8 paia di basi, risultando non funzionale e permettendo quindi l'accumulo della 2-acetil-1-pirrolina.

La varietà aromatica Iarim, di cui l'Enr è costitutore, è stata ottenuta tramite l'utilizzo della Sam che ha permesso di rilevare all'interno di alcune linee, derivate tramite incrocio mirato finalizzato all'ottenimento di varietà aromatiche, i genotipi portatori del gene associato al carattere aroma.

### Per quanto riguarda la caratterizzazione del contenuto in amilosio?

L'amilosio è considerato il principale componente dell'amido di riso, composto da amilosio e

amilopeptina, in grado di influenzare il comportamento alla cottura ed alla masticazione del granello di riso. Se il rapporto amilosio su amilopectina è a favore dell'amilosio, migliora la capacità dell'amido di assorbire acqua durante la cottura e il granello mantiene una certa consistenza, riducendo la collosità superficiale; se risulta favorita l'amilopeptina invece, dopo cottura, si ottengono dei granelli con una notevole collosità, non adatti per la preparazione di risotti o minestre. Le diverse varietà di riso vengono classificate in base al contenuto di amilosio del granello: risi glutinosi o *waxy* (0-4%), risi a contenuto di amilosio molto basso (5-9%), risi a contenuto di amilosio basso (10-19%), risi a contenuto di amilosio intermedio (20-25%) e risi a contenuto di amilosio alto (> 25%). Il contenuto di amilosio determina i diversi usi alimentari del riso: risotto, minestre, contorni, dolci, ecc.

### Quali analisi sono condotte sull'amilosio?

Il contenuto di amilosio, fattore importante della qualità dell'amido, è controllato dal gene *waxy* che codifica per l'enzima amido sintasi, legata ai granuli (gbss). Questo gene presenta dei polimorfismi detti Snp (Polimorfismi a singolo nucleotide) correlati con il contenuto in amilosio. In particolare gli Snp1 e Snp4 presentano dei polimorfismi, indipendenti dall'interazione genotipo-ambiente, in grado di classificare i genotipi in 4 gruppi, in base al loro contenuto di amilosio: amilosio < 5% (*waxy*), amilosio basso < 21%, amilosio intermedio da 21 a 26 % e amilosio alto > 26%. Quest'analisi, come tutte le analisi basate su metodiche molecolari, richiede l'impiego di poco materiale fogliare senza distruggere il seme dei genotipi in corso di selezione, che verrà poi utilizzato per il lavoro di breeding sulle generazioni successive.

### Cosa permettono di determinare?

Le analisi permettono di caratterizzare i genotipi in fase di selezione per determinare il loro contenuto in amilosio e confermare la loro effettiva appartenenza ad un determinato programma di breeding svolto all'Enr. In caso contrario, il genotipo verrà eliminato o ricollocato in un diverso programma di breeding se ritenuto interessante per altre caratteristiche.

(Segue da pagina 11)

e merceologiche che presuppongono l'utilizzo di apparecchiature anche sofisticate e tecnici formati, è stata affiancata all'analisi descrittiva che consente di descrivere e quantificare le proprietà sensoriali delle diverse varietà. Tra queste l'aroma, una caratteristica particolarmente apprezzata in alcune aree asiatiche, ma di recente anche in Europa e nel mercato italiano. È infatti uno dei caratteri valutati per l'iscrizione al Registro. L'aroma tipico delle varietà cosiddette aromatiche, simile al pop-corn, viene rilasciato in cottura o già in fase di lavorazione se la sua caratterizzazione genetica è particolarmente intensa. I primi studi per conoscere e dare un nome ai composti caratterizzanti risalgono al 1965, ma solo nel 1982 è stata identificata la 2-acetil-1-pirrolina (2AP), percepibile anche a basse concentrazioni e per questo ritenuta la principale componente aromatica. È il composto che concorre in maggior misura, all'interno di un gruppo di sostanze aromatiche, ma diminuisce con l'invecchiamento del riso.

È presente in tutti i risi, ma nelle varietà aromatiche lo si trova con concentrazioni 15 volte superiori (Simonelli C, Cormegna M, Tonello M. "Valutare i risi aromatici". L'Assaggio - Scienze sensoriali per l'alimentazione, n. 56, inverno 2016).

La valutazione sensoriale di questi risi viene effettuata su riso lavorato, da giudici addestrati che devono valutare l'assenza o l'intensità dell'aroma in confronto alla varietà Gange, il riferimento caratterizzato dal forte aroma e odore di pop-corn (Figura 1), iscritto nel Registro fra le varietà aromatiche italiane selezionate, insieme ad Apollo, Asia, Brezza, Elettra, Febo,

Fragrance, Gange, Giano, Giglio, Iarim (risi lavorati - Superfino); Ermes (riso integrale - Superfino); Venere (riso integrale - Semifino).

### Le indagini genetiche

Parallelamente alle analisi chimiche-merceologiche il Centro di Ricerche lavora alla caratterizzazione del gene associato alla presenza di aroma. Ma non è l'unico filone di ricerca, ci spiega **Laetitia Borgo**, responsabile del Laboratorio di Biologia molecolare del Centro che sorge a Castello D'Agogna, vicino a Mortara (Pavia) (vedi intervista a pagina 12).

Le tecniche di biologia molecolare basate sullo studio del Dna mediante analisi PCR permettono di caratterizzare una determinata varietà sotto diversi aspetti.

Consentono per esempio di caratterizzare il materiale genetico o effettuare l'identificazione varietale mediante la tecnica del *fingerprinting* del Dna (o impronta genetica), che consente l'identificazione individuale a livello molecolare, analizzando le caratteristiche uniche del Dna di un individuo, rendendolo riconoscibile e rintracciabile.

Tramite le tecniche di Selezione assistita da marcatori molecolari (Sam) è invece possibile accelerare e semplificare la selezione delle migliori caratteristiche delle piante attraverso incroci ripetuti. La Sam si fonda sul principio che la diversità biologica presente all'interno di una stessa specie offre la possibilità di individuare varietà sessualmente compatibili con quelle di interesse commerciale, in grado di esprimere caratteristiche particolari. In effetti, la Sam individua in una pianta la sequenza genica associata al carattere desiderato (ad esempio maggiore produttività,

resistenza ai parassiti, migliori qualità nutritive, ecc.) ed effettua **incroci mirati** finché il gene non si è stabilizzato nelle nuove varietà (Figura 2). Infine, con la biologia molecolare l'Enr accerta l'assenza di **eventuali contaminazioni** di organismi geneticamente modificati nel riso. In alcuni Paesi sono state sviluppate varietà di riso Ogm e la più conosciuta è il Golden Rice, ingegnerizzata nel 1999 per produrre  $\beta$ -carotene per sopperire alla deficienza di vitamina A. Altre varietà di riso Ogm sono state sviluppate per la **resistenza a erbicidi** (LLRice62 e LLRice601) oppure a **insetti** (Bt63).

Il Laboratorio di Biologia molecolare dell'Ente Nazionale Risi è stato creato nel 2006 proprio con la finalità di effettuare Selezione assistita con i marcatori molecolari, spiega Borgo, quale supporto ai programmi di *breeding* tradizionale, finalizzati alla costituzione di varietà di riso resistenti al patogeno fungino *Pyricularia grisea* (Figura 3), un parassita che attacca la pianta in tutti i suoi stadi inducendo perdite di prodotto del 30% in Italia (fino all'80% nel mondo); di varietà aromatiche e di varietà con un determinato contenuto in amilosio.

Una gran parte del lavoro consiste anche nel mettere a punto analisi molecolari, al fine di rispondere ad esigenze specifiche della filiera, come appunto le analisi per la rilevazione di contaminazioni da parte di organismi geneticamente modificati.

A partire da dicembre 2011, attraverso l'adozione di un Sistema Qualità conforme ai requisiti della Norma Uni Cei En Iso/Iec 17025, la prova di screening Ogm per la ricerca del promotore CaMV35S e del terminatore NOS è accreditata Accredia.