

Ruskeiden kananmunien kalanhaju historiaan

M. Honkatukia,¹ K. Reese,² R. Preisinger,³ M. Tuiskula-Haavisto,¹ S. Weigend,² J. Roito,¹ A. Mäki-Tanila,¹ and J. Vilkki¹

¹*MTT Agrifood Research Finland, 31600 Jokioinen, Finland,*

²*Institute for Animal Breeding Mariensee (FAL), 31535 Neustadt, Germany,*

³*Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, Germany.*

Tiivistelmä

Ruskeissa kananmunissa esiintyvä kalanhaju on aiheuttanut mittavia ongelmia niin kananjalostukselle, tuottajille kuin kaupallekin. Ongelma koskettaa erityisesti eurooppalaisia kuluttajia, sillä EU-alueella yli 90% kulutetuista munista on ruskeita. Suomessa ongelma on toistaiseksi ollut marginaalinen, sillä kulutustottumukset ovat suosineet valkoisia munia, ruskeiden myyntiosuuden jäädessä alle kymmeneen prosenttiin.

Kuluttajan näkökulmasta ongelma kärjistyy ruoanlaitossa: hajun on toisinaan havaittu voimistuvan käsiteltäessä munia kuten esimerkiksi keitettäessä tai paistettaessa. Kaupan laadunvalvonnan satunnaistesteistä löydettyjä kalanhajuisia muna- tai paistettuja muna- tuotteita voidaan hylkäämiseen. Pahimmassa tapauksessa tuottaja joutuu vaihtamaan koko kanalansa tuotantoeläimet muutaman haisevan munan takia.

Hajun aiheuttava geeni tunnistettiin geenikartoituksen avulla. Taustalla on geenivirhe, joka johtaa hajuhaittaan, kuitenkin vain yhdessä tietynlaisen, yleensä rypsi- tai rapsipohjaisen ruokinnan kanssa. Valkoisilta kanoilta tämä geenivirhe puuttuu. Ruskeidenkaan kanojen munat eivät haise, elleivät geenivirheen perineet kanat ole saaneet rehua, joka sisältää hajun aiheuttajaa. Yleensä noin noin 5-10 prosenttia ruskeista kanoista voi tuottaa haisevia muna- tuotteita.

Perinteisesti DNA-tutkimuksiin on vaadittu verinäytettä, jonka ottaminen voi pahimmillaan olla kanalle stressaava ja kivulias kokemus. Sen sijaan on mahdollista käyttää testauksessa höyheniä: jo yhdessä höyhentupessa on riittävä määrä DNA:ta, josta testi voidaan tehdä. Geenivirheen testaamiseksi onkin kehitetty höyhenestä tehtävä nopea ja yksinkertainen laboratoriomenetelmä. Menetelmän ansiosta voidaan ruskeita kanalinjoja valita risteytettäväksi niin, ettei jälkeläisissä ilmene hajuhaittaa aiheuttavaa geenivirhettä.

Testausmenetelmälle on haettu kansainvälistä patenttia. Tällä menetelmällä jalostettujen kanalinjojen markkinointi aloitetaan vuoden lopussa ja ensimmäiset hajuttomat untuvikot ovat myynnissä elokuussa 2006. Nämä kanat aloittavat munintansa vuoden 2007 alussa. Testin ansiosta luomutuotannossa on mahdollista käyttää rehun valkuaislähteenä kotimaista rypsiä ja rapsia, mahdollisesti siirryttäessä 100 %:n luomuruokintaan.

Avainsanat: Kananmuna, kalanhaju, geenikartoitus, geenitesti.

Johdanto

Vastamunitut munat voivat toisinaan haista mädäntyneelle kalalle. Erityisesti ongelma vaivaa ruskeita munijalinjoja. Ongelmaa on tutkittu 1970-luvulta lähtien, joilloin munijakanojen rehuun alettiin lisätä rypsirouhetta ja hajua alkoi ilmetä. Koska hajuhaittaa esiintyi erityisesti ruskeilla munijalinjoilla, syntyi virheellinen johtopäätös kalanhajun ja kuorenvärin kytkennästä. Myöhemmin osoitettiin, että haju johtuu kuorenväristä riippumattomasta perintötekijästä; aiheuttaja oli keltuaisen sisältämä ylenmääräinen trimetyyliamiini (TMA) –yhdiste.

Hajuoireyhtymästä eivät kärsi yksinomaan kanat; sitä tavataan myös ihmisiltä ja lehmältä. Ihmisillä oireet ilmenevät kehon eritteiden, kuten hien, syljen ja virtsan epämiellyttävänä hajuna. Oireyhtymää kantavat lehmät puolestaan voivat erittää maitoonsa kalanhajua ja –makua.

Normaalisti maksan entsyymi, mono-oksigenaasi (*flavin containing mono-oxygenase 3*, *FMO3*) katalysoi elimistössä olevan trimetyyliamiinin hapettumisreaktiota hajuttomaksi yhdisteeksi, joka poistuu eritteiden mukana elimistöstä. Ihmisellä ja lehmällä kalanhaju –syndrooman syyksi on osoitettu *FMO3* –geenin muutokset, jotka johtavat siihen että eritteisiin päätyy hapettamatonta TMA:ta, jolle on ominaista mädän kalan haju. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää saman geenin osuutta tuoreiden kananmunien kalanhajuun geenikartoituksen avulla.

Aineisto ja menetelmät

Haju-ominaisuuden ja *FMO3*-geenin kytkentäkartoitus tehtiin kahdessa toisistaan riippumattomassa puolisisarusaineistossa. Ensimmäiseen kartoituspopulaatioon kuului 5 puolisisarusperhettä, täyssisarusten lukumäärien vaihdellessa 90 ja 120 välillä. Aineistossa tehtiin koko genomien kattava kytkentäkartoitus. Geneettisinä markkereina käytettiin 119 mikrosatelliittimarkkeria 25:stä eri kytkentäryhmästä.

Haju-fenotyyppiä tutkittiin kahden viikon ruokintakokeen jälkeen. Ruokintakokeessa munivien kanojen rehuun oli lisätty 10 % rypsirouhetta. Arvioiminen tapahtui aistinvaraisesti rikotuista munista.

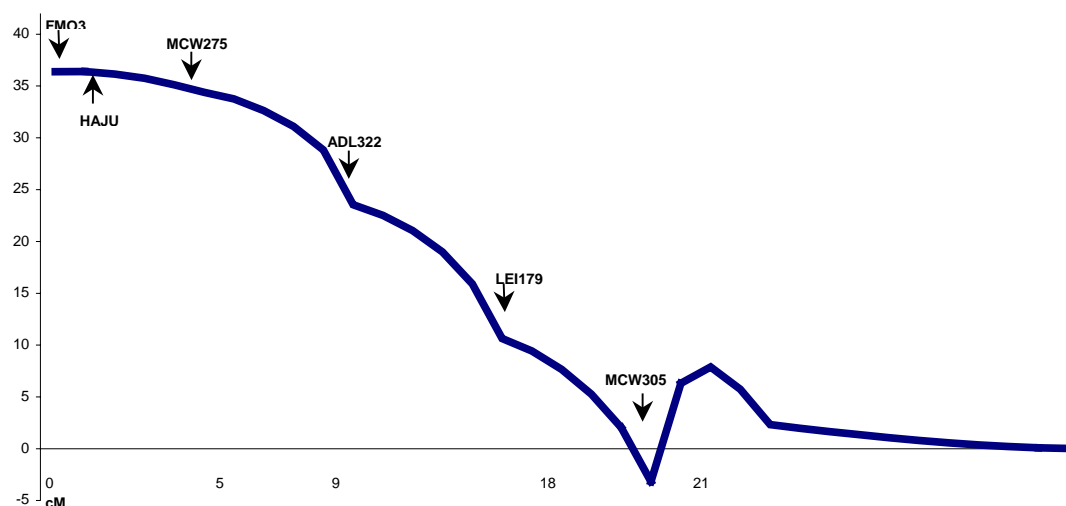
Ensimmäisessä kartoitusvaiheessa käytettiin DNA-poolinäytteitä, jolloin yhdestä puolisisarusperheestä tuli analysoitavaksi kaksi näytettä fenotyyppijakauman ääripäistä: haisevat ja normaalit. Poolianalyysillä etsittiin alueita genomista, joissa näkyy isän markkerialleelien jakaumien vinoutuneisuus vastakkaisten (haju/normaali) poolinäytteiden välillä. Tutkimus eteni tyypittämällä perheitä yksilötasolla poolianalyysin tulosten osoittamassa kohdassa genomia.

Toinen kartoituspopulaatio koostui 450 F₂-kanasta. Sitä käytettiin sekä kytkentätulosten vahvistamiseksi että TMA:n assosiaatioanalyyysiin. Tästä populaatiosta haju määritettiin biokemiallisesti mittaamalla TMA-pitoisuutta.

Markkerigenotyyppitysten ohella sekvensoitiin kandidaattigeeniä (*FMO3*; flavin containing mono-oxygenase 3). Sekvenssoinnissa etsittiin haisevien ja normaalien yksilöiden väliltä DNA-tason eroavaisuuksia. Sekvensointi tuotti useita yhden emäksen eroja DNA-tasolla (SNP, single nucleotide polymorphism). Yhtä näistä SNP-kohdista käytettiin geneettisenä markkerina kytkentäanalyyseissä.

Tulokset

Poolien jakaumien vinoutta löytyi usean kytkentäryhmän (GGA4, GGA7, GGA8 ja E46C08W18) yksittäisistä markkereista. Ainoastaan kromosomi 8:n (GGA8) tulokset näyttivät olevan johdonmukaisia verrattaessa vierekkäisiä markkereita eri perheissä. Tämän perusteella kytkentäanalyysejä jatkettiin tässä kromosomissa. Kaikki yksilöt tyypitettiin neljällä mikrosatelliittimarkkerilla (MCW0275, ADL0322, LEI0179, MCW0305) ja kandidaattigeenin *FMO3* SNP-markkerilla viidessä perheessä. Kartoituksen avulla paikannettiin *FMO3* –geeni kromosomiin 8. Samoin voitiin osoittaa, että hajuoireella oli tiivis kytkentä kandidaattigeeniin.



Kuva 1. KytKentäkarta kromosomista 8. Kartoittamisessa käytettiin neljää mikrosatelliittimarkkeria (MCW275, ADL322, LEI179 ja MCW305) sekä yhtä SNP-markkeria FMO3 -geenistä (FMO3). Haju kartoitettiin assosiaatioanalyysin avulla kytKentäkartalle.

KytKentäanalyysin tulokset varmistettiin riippumattomassa tutkimusaineistossa. Tästä aineistosta saatiin hajulle luotettava biokemiallinen määrittely keltuaisen TMA-pitoisuutena.

Sekvensoinnin tuloksena havaittiin 17 eroavaisuutta haisevien ja normaalien yksilöiden väliltä. Yhdeksän muutoskohtaa osuu geenin koodaavalle alueelle, mutta vain yksi eroavaisuus johtaa aminohappomuutokseen. Muutos T329S sijaitsee FMO3-proteiinin hyvin konservoituneella (ns. FATGY -motif) alueella, joka on säilynyt evoluution aikana samanlaisena mono-oksigenaasin kaltaisissa proteiineissa aina bakteereista ihmiselle (Kuva 2). Sama muutos havaittiin kaikissa kolmessa tutkitussa ruskeassa munijakanalinajssa (Tetra, Isa Brown, Lohmann Brown). Alleeli S esiintyi homotsygoottina kaikissa kanoissa, joiden munissa oli havaittu korkea TMA-pitoisuus, eikä koskaan kanoissa, joiden munat eivät haisseet rypsirokokinnan jälkeen.

Taulukko 1. T329 mutaation yleisyys eri kanapopulaatioissa: kaupallisilla ruskeilla munijalinjoilla (Isa Brown, Lohmann Brown, TETRA) ja muutamassa erikoispopulaatioissa (Marans, puolalainen ja islantilainen maatiaiskana, transylvanialainen kana). (S=haiseva)

	N	Alleelifrekvenssi	
		T	S
Viidakkokana (<i>Gallus gallus gallus</i>)	10	1.00	0.00
Fayoumi	10	1.00	0.00
puolalainen maatiaiskana (green-legged partridge)	8	0.81	0.19
islantilainen maatiaiskana	10	1.00	0.00
ISA Brown	71	0.58	0.42
Lohmann Brown	67	0.62	0.38
Marans	111	0.96	0.04
TETRA	70	0.61	0.39
Transylvanialainen kana (transylvanian naked-neck)	8	0.69	0.31

Kuva 2. *FMO* –proteiiniperheen sekvenssilinjaus aminohappomuutuskohdassa T329S (-faTgy-). Proteiinin nimi ja eliölaji on esitetty vasemmalla, oikealla 20 aminohapon mittainen sekvenssi mutaatiokohdan ympäriltä. Konservoitumisastetta kuvaavat värikoodit; mustalla merkitty aminohappo esiintyy jokaisella eliölajissa, harmaa >80 %:lla eliöistä.

```

Leptospira_interrogans : GSEEEIDVVIYCFATGYDVKFP
Streptomyces_coelicolor : GSRETVDVVYATGYSLSFP
Nitrosomonas_europaea : NATAQYDVLIAATGYKISFP
FMO5_Guineapig : SREDDIDAVIFATGYSFDFP
FMO5_Human : SREDDIDAVIFATGYSFDFP
FMO5_Rat : SREDDIDVVI FATGYSFAFP
FMO5_Mouse : SREDGIDVVI FATGYSFAFP
FMO5_Rabbit : SREDDIDAVIFATGYSFDFP
FMO3_chicken_affected : TVQDDLDAVIFATGYSHSFP
FMO3_Chicken : TVQDDLDAVIFATGYSHSFP
FMO3_Human : TIFEGIDCVIFATGYSFAYP
FMO3_Chimpanzee : TIFEGIDCVIFATGYSFAYP
FMO3_Rhesus_macaque : TTFEGIDCVIFATGYSYTYT
FMO3_Dog : TVFEAIDCVIFATGYNAYP
FMO3_Bovine : TVFKAIDYVIFATGYSYAYP
FMO3_Mouse : TMFEAIDCVIFATGYGYAYP
FMO3_Rat : TVFEGIDCVIFATGYGYAYP
FMO3_Rabbit : TVFEAIDSVIFATGYGYAYP
FMO1_Dog : PKEEPIDIIVFATGYTFAFP
FMO1_Pig : PEEEPIDIIVFATGYTFAFP
FMO1_Human : SKEEPIDIIVFATGYTFAFP
FMO1_Rabbit : PSEEPIDVIVFATGYTFAFP
FMO1_Mouse : PKEEPIDIIVFATGYTFAFP
FMO1_Rat : PKEEPIDVIVFATGYSFAFP
FMO2_Gorilla : TVEENIDVII FATGYSFDFP
FMO2_Chimpanzee : TVEENIDVII FATGYSFDFP
FMO2_Human : TVEENIDVII FATGYSFDFP
FMO2_Rhesus_macaque : TVEENIDVII FATGYSFDFP
FMO2_Guineapig : TVEEDIDVIVFATGYTFDFP
FMO2_Mouse : TVEEDVDIIVFATGYTFDFP
FMO2_Rat : TVEEDVDVIVFATGYTFDFP
FMO4_Human : TVEENIDVVI FTTCGYTFDFP
FMO4_Rabbit : TVEENIDSVI FTTCGYVDFDFP
FMO4_Rat : TLEANIDVVI FTTCGYEFDSP
FMO4_Mouse : TTEANIDVVI FTTCGYEFDSP
Methylophaga_sp : GSSEKVDAILLCATGYLHDFP
Arabidopsis_thaliana : GKTISVDVIMHCCATGYKYHFP
D fatGY p

```

Johtopäätökset

Tässä tutkimuksessa on osoitettu, että kananmunien kalanhajun syy johtuu geenivirheestä *FMO3* –geenissä. Lisäksi geeni on pystytty luotettavasti paikallistamaan kromosomiin 8. Edelleen, geenivirheen testaamiseksi on kehitetty luotettava ja nopea geenitesti.

Alunperin harmiton hajun aiheuttava geenimuunnos lienee syntynyt kauan aikaa sitten yksilössä, josta useimmat ruskeat munijalinjat polveutuvat. Hajugeeni on näin päässyt yleistymään ruskeissa kanoissa (taulukko 1). Valkoisista munijalinoista muutosta ei olla tavattu.

Tutkimustulosten perusteella geenivirheen ei ole havaittu vaikuttavan mihinkään muihin tuotanto- tai laatuominaisuuksiin hajua lukuunottamatta.

Geenitesti mahdollistaa sen esimerkiksi, että luomutuottajat eivät ole enää sidottuja käyttämään eri tuotantohybrideille tiettyä rehua, vaan ruskeillekin munijakanoille voidaan syöttää rypsipitoista rehua. Jos luomutuotannossa siirrytään 100 %:sti luomurehuruokintaan, on kotimainen rypsi- ja rapsirehu varteenotettava raaka-aine munijakanojen valkuaistarpeen tyydyttämisessä, erityisesti rikkipitoisten aminohappojen lähteenä.

Kirjallisuus

M. Honkatukia, K. Reese, R. Preisinger, M. Tuiskula-Haavisto, S. Weigend, J. Roito, A. Mäki-Tanila and J. Vilkki. 2005. Fishy taint in chicken eggs is associated with a substitution within a conserved motif of the *FMO3* gene. *Genomics* 86: 225-232.

M. Honkatukia. 2005. Geenitestistä apua kananmunien kalanhajuihin laatuongelmaan. *Suomen siipikarja* 3/05.