

RAPPORT TILSKUDD TIL FISKERIFORSKNING 2025

SJØPØLSE-POPGEN, Møreforskning

Bakgrunn

En intensivt fangsting av nye marine evertebrater som krepsdyr, bløtdyr og pigghuder kan forventes som følge av nyutviklet ROV-basert fangstteknologi og høy markedspris. Sjøpølsene hører inn under pigghudene og rødpolsen (*Parastichopus tremulus*) er en art som finnes langs hele norskekysten, men som man har lite kunnskap om. Rødpølsen forekommer ofte som bifangst i kommersielt trål- og teinefiske. Særsilt tillatelse til høsting av sjøpølse kan gis av Fiskeridirektoratet basert på geografisk område og redskapstype. Det er stor interesse for å utnytte denne ressursen, og i et fremtidig bærekraftperspektiv er det viktig å besvare biologiske spørsmål om bestander for å kunne levere kunnskapsbaserte råd til forvaltningen. Prosjektet SJØPØLSE-POPGEN har som mål å fylle kunnskapshull knyttet til populasjonsstruktur og livshistorie ved hjelp av genetiske metoder.

Prosjektet som helhet har en tidsramme på to år (2025-2026). Denne rapporten omfatter arbeid utført i 2025 hvor bidraget fra Fiskeridirektoratets tilskuddsordning ble benyttet til å samle inn verdifullt biologisk materiale av rødpoelse fra tre ulike geografiske områder i henholdsvis Vestland, Møre og Romsdal og Trøndelag. Dette materialet vil bidra med ny innsikt om rødpoelsens populasjonsbiologi. Genetisk informasjon er nødvendig for å få svar på om vi har distinkte populasjoner og i hvilken grad de divergerer mellom geografiske områder. Genteknologiske metoder som mikrosatellittanalyse er nyttige verktøy for å studere demografiske relasjoner, og metoden er under utvikling for rødpoelsen ved Møreforskning.

Mål og tidsplan

Prosjektet hadde tre hovedmål og flere delmål relatert til aktiviteter (1, 2 og 3) i 2025 og 2026.

1. Sammenlikne rødpoelser fra utvalgte geografiske områder (**2025**).
 - a. Beskrive rødpoelsene fenotypisk (lengde, vekt, farge og omkrets).
 - b. Samle inn vevsprøver fra organene respiratorisk tre og gonade fra alle fenotypisk beskrevne individer.
 - c. Kjønnbestemmelse ved mikroskopering av gonade.
2. Undersøke om ikke-invasiv prøvetakingsmetode med svaber for uttak av vev gir tilstrekkelig materiale for DNA analyse (**2025**).
 - a. Innsamling av prøve med svaber.
 - b. Ekstrahere DNA fra respiratorisk tre og svaberprøver for molekylær genetisk analyse.
3. Utvikle mikrosatellitt metode for genotyping og populasjonsstudier på rødpoelse (**2026**).
 - a. Finne frem til mikrosatellittmarkører for identifisering av kjønn ved kobling av markør til observert kjønn.
 - b. Finne egnede polymorfe mikrosatellittmarkører som kan skille individer innen en populasjon fra hverandre.
 - c. Benytte markørene til å se på slektskap innen og mellom populasjoner av rødpoelse, inkludert eventuell underart.

Gjennomføring, materialer og metoder

Prosjektet hadde som mål å sammenlikne rødspølser fra utvalgte områder på strekningen Agder til Trøndelag. I denne omgang ble det samarbeidet med tre kommersielle aktører: Kjeøy Fiskeri AS, Farstad Fjordfiske og Askøykreps AS, som fangster sjøkreps med teiner hvor rødspølsen ofte forekommer som bifangst. Det ble innhentet materiale fra Trøndelag (Frohavet) med fartøyet Tessa (TR-200-F), fra Møre og Romsdal (Grytafjorden) med Snøgg (M-29-G) og fra Vestland (Hjeltefjorden) med Fangst (H-14-A). I tillegg til fartøyets mannskap deltok forskere fra Møreforskning under fangst og prøvetaking ombord. Videre prøvetaking og fenotypisk beskrivelse ble utført av Møreforskning umiddelbart etter ankomst til kai.

Innsamlingen av materialet ble foretatt i perioden mai-juni da det var forventet at rødspølsene hadde modne gonader. Fangstdyp var fra 108 til 230 m. Antall teiner per lenke varierte mellom aktørene: 60 (Tessa), 30 (Snøgg) og 80 (Fangst). Fangstmengde - antall individer per teine og lenke ($\pm$ sd, n) var henholdsvis 0.31 ($\pm$ 0.08, 6), 0.04 ($\pm$ 0.07, 13) og 0.05 ($\pm$ 0.09, 5) for de tre fartøyene. Det ble innhentet materiale fra 30 individer i Trøndelag, 17 i Møre og Romsdal, og 23 i Vestland.

Det ble tatt svaberprøver av samtlige innsamlede sjøpølser fra oversiden av kroppen med Isohelix DNA buccal swabs (Isohelix, MS-01) med RapiDri silikagell ampulle for umiddelbar stabilisering og preservering av DNA via tørking. Ekstraksjon av DNA ble utført i en væskebasert stabiliserings løsning 400 μ l «QuickExtract DNA Extraction Solution» med tilsatt «Ready-Lyse-Lysozyme» løsning (BioSearchTech) 250 U, som i prinsippet skal forenkle molekylært arbeid ved å produsere PCR-klart lysat av både eukaryote og prokaryote celler på svaber etter inkubasjon i romtemperatur 15 min, 65°C i 10 min og 95°C i 2 min med vortexing mellom stegene.

Det ble også ekstrahert DNA av vevsprøver (2x2 mm) fra kroppsvegg, gonade og respiratorisk tre med bruk av «QuickExtract DNA Extraction Solution» tilsatt «Ready-Lyse-Lysozyme» løsning. DNA konsentrasjon ble målt på et Qubit4 (ThermoFischer) fluorometer. Egnethet for PCR ble undersøkt ved PCR på målgener for sjøpølse og mikrober ved henholdsvis Cytochrome oxidase I (*coi*) og 16S rRNA (16S). Kontroll av PCR produkter ble utført på TapeStation (Agilent) med D5000 kit som gir god oppløsning av fragmentfordeling.

Prosjektet drar nytte av synergier og ekspertise gjennom pågående prosjekter, spesielt fra EU-prosjektet BLUES (<https://projectblues.eu/>) med bidrag innen molekylærbiologi og bioinformatikk. Utvikling av mikrosatelittmarkører er i gang og en systematisk undersøkelse av 95 ulike potensielle markører fra et lite utvalg (n=5) er underveis. Markørene er hentet fra genomet som ble sekvensert her ved Møreforskning (DOI: 10.1139/gen-2025-0015). Med bakgrunn i genomet har unike primersett blitt designet for hver markør og målområdet kopiert opp med PCR. Neste trinn er analyse ved sangersekvensering. Det forventes at antallet markører etter denne første runden vil bli redusert. Markører som ikke viser noen variasjon, eller for stor variasjon i antallet av repeterte elementer, fjernes fra panelet. Utviklingen vil kreve flere iterasjoner med reduksjon i antall markører og en tilsvarende økning i utvalg av prøver før metoden er helt på plass. Målet er et panel på 8-20 markører. Resultatene fra utviklingen og metoden vil bli publisert gjennom BLUES med referanse til prosjektet SJØPØLSE-POPGEN og tilskudd til fiskeriforskning fra Fiskeridirektoratet.

Prosjektets bidrag til måloppnåelse, Foreløpige resultater

Resultat hovedmål 1, Sammenligning av rødpølse fra tre ulike geografiske områder.

Samtlige mål og delmål i aktivitet 1 har blitt oppnådd. Alle sjøpølser som ble samlet inn har blitt beskrevet fenotypisk med data på lengde, omkrets, vekt, farge, kjønn, og gonadeindeks beregnet som våtvekt gonade av total våtvekt (Tabell 1 og 2). I tillegg ble alle individ fotografert fra oversiden, undersiden og fra siden. Etter fenotypisk beskrivelse, disseksjon og kjønnsbestemmelse, ble vevsprøver av kroppsvegg, tarm, gonade og respiratorisk tre preservert og katalogisert. Sjøpølser kan kvitte seg med tarm og respiratorisk tre dersom de blir stresset. Dette medfører derfor at ikke alle prøver er katalogisert med alle vevstyper. Parasitter, bl.a. artsspesifikke *Enteroxenos östergreni* ble observert i totalt 14 av prøvene.

Tabell 1. Gonadeindeks og kjønnsfordeling.

OMRÅDE:	TRØNDELAG	MØRE OG ROMSDAL	VESTLAND
GI (%) SNITT	1.31	2.70	2.80
SD	0.810	2.037	1.712
N	29	15	22
# HUNNER	11	na	12
# HANNER	18	na	10
MÅNED	mai-juni	mai	juni
HUNN:HANN	0.6:1	1.3:1*	1.2:1

*from Christophersen et al. 2020

Tabell 2. Våtvekt og lengde.

OMRÅDE:	TRØNDELAG	MØRE OG ROMSDAL	VESTLAND
VEKT (G) SNITT	106,5	103,0	224,4
MAX	194,2	358,7	649,0
MIN	45,1	25,9	73,1
LENGDE (MM) SNITT	136,5	171,2	175,7
MAX	180,0	300,0	300,0
MIN	90,0	120,0	120,0
N	18	15	22

Resultat hovedmål 2, Testing av ikke invasiv prøvetaking i felt med svaber og DNA analyse.

Samtlige aktiviteter under delmål 2 har blitt utført. Det ble utarbeidet en prøvetakingsprotokoll for uttak av vev til sjøs med svabermetode for innsamling av materiale til DNA-analyser. Metoden er utarbeidet med tanke på et oppsett som er lett overførbart til andre aktuelle fartøy og som forenkler innsamling av DNA prøver.

Prøveuttakingsmetoden for innhenting av kvalitets-DNA fra rødølslen ble videre utviklet hos Møreforskning. Utvalgte prøver (15) fra de tre lokalitetene ble ekstrahert i september etter 3 måneders lagring. For å undersøke om mengden DNA som kunne ekstraheres varierte med lagringstiden av prøvene, ble det utført analyser også etter 6 måneder samt analyser fra en kontrollgruppe med kort lagringstid (3 dager og 1 uke lagring). Målt DNA fra ekstraksjonene varierte (Tabell 3). Variasjoner i mengde DNA ekstrahert kan skyldes forskjeller i hvor mye vev som sitter på hver enkelt svaber og antakeligvis også med tiden som har gått fra prøvetaking til ekstraksjon.

Tabell 3. Oppnådde DNA konsentrasjoner i ng/μl etter prøvetaking

PRØVER EKSTRAHERT	N	SNITT	MIN	MAX
KONTROLL 3-6 DAGER	4	2,06	1,49	2,62
3 MÅNEDER	15	6,5	1,96	12
6 MÅNEDER	5	1,27	0,93	1,3

PCR ble inhibert med bruk av DNA fra svaber, både for *coi* og for 16S. Som en enkel kontroll på inhibisjon (blokkering) av PCR ble *coi* PCR også kjørt på reaksjoner med 10, 5, 3 og 1 μl input. Alle prøver var negative, men PCR artefakter som primer-dimer (små kunstige PCR produkter som regel 50-150 baser lange) som ofte blir produsert i tilfeller hvor det er lite av målgenet til stede ble produsert av negative kontroller (ca syklus 25-28), og på prøver med 1μl input helt mot slutten av PCR (ca syklus 35-38). Kurvene for 3 og 5 μl input var helt flate, hverken primer-dimer eller produkt. Dette indikerer mest sannsynlig inhibering av PCR. PCR produkt ble verifisert på Tapestation som bekreftet primer-dimer.

For å sjekke ekstraksjonsmetoden videre, prøvde vi ut DNA ekstraksjon av vev fra gonade og respiratorisk tre. Prøver fra hanner fungerte bra med hensyn på både DNA utbytte og funksjonalitet i PCR (90 ng/μl i gjennomsnitt over 6 ekstraksjoner). For prøver fra hunner fungerte den samme metoden ikke særlig bra, hverken med hensyn på DNA utbytte eller funksjonalitet i PCR (1,7 ng/μl i gjennomsnitt over 12 ekstraksjoner). Ekstraksjon fra respiratorisk tre resulterte også i relativt lavt utbytte (7,6 ng/μl i gjennomsnitt).

Foreløpig konklusjon er at metoden ikke fungerer optimalt. Selve innsamlingen og bevaringen av prøven fungerte fint, men ekstraksjonsmetoden i etterkant er ikke god nok til å håndtere inhibitorer. Her gjenstår det utfordringer for å få til en fungerende prøvetakingsmetode for rødølslen i felt som bevarer DNA, og som samtidig kan håndtere eller fjerne komponenter som inhiberer nedstrøms metoder som PCR.

Resultat hovedmål 3, Utvikling av mikrosatellitt metode for genotyping og populasjonsstudier på rødølslen.

Aktiviteter under delmål 3 er underveis i henhold til planlagt arbeid i EU-prosjektet BLUES (<https://projectblues.eu/>). Genomet til *P. tremulus* (rådata publisert: PRJNA1021777) som er sekvensert ved Møreforskning benyttes nå i den pågående utviklingen av genetiske analyseverktøy. I BLUES benyttes rødølslen som modellart for etablering av cellelinjer for å bedre kunne studere bioaktive komponenter som kan være med på å forbedre human helse og ernæring. Som del av valideringen av cellelinjene, utvikler vi nå redskap for genetisk testing ved hjelp av mikrosatellitter. Så

langt har flere tusen potensielle mikrosatelitter blitt identifisert og et utvalg av 95 ulike mikrosatelitter har blitt selektert og screenes nå opp mot et lite utvalg ved hjelp av PCR og Sanger sekvensering. Arbeidet med mikrosatelittene er tid- og ressurskrevende. Gjennom prosjekt SJØPØLSE-POPGEN har vi sikret materiale med genetisk variasjon som vil bidra i denne utviklingsfasen og danne grunnlaget for fremtidige populasjonsstudier basert på data fra utviklingen av mikrosatelittene.

Dato: 08.12.2025, **Sted:** Ålesund

Prosjektleder: Roger Meisal

Signatur: _____

