





## Estudios preliminares de las características espermáticas y de criopreservación del coral formador de arrecifes *Orbicella faveolata*.

### Preliminary studies of sperm traits and cryopreservation of the Caribbean reef building coral *Orbicella Faveolata*.

María Juliana Vanegas<sup>1</sup> and Valeria Pizarro<sup>2</sup>

 0000-0002-0125-0728

 0000-0002-0161-3074

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras Jose Benito Vives de "Andrés" - INVEMAR. For correspondence: majuli\_19@hotmail.com

<sup>2</sup> Fundación para la Investigación y Conservación Biológica Marina – Ecomares, Colombia. valeria.pizarro@ecomares.org

#### RESUMEN

La criopreservación ha sido recientemente aplicada a gametos y tejidos coralinos obteniendo resultados exitosos que pueden ser utilizados para la conservación y la restauración de arrecifes de coral. En este artículo, se determinó la morfología espermática del coral *Orbicella faveolata* y la viabilidad de la criopreservación del espermatozoides utilizando una combinación de crioprotectores intracelulares (1,2-Propadiol) y extracelulares (leche) en dos tratamientos de congelación durante 24 h. Los espermatozoides maduros tienen una cabeza con forma triangular de  $4.10 \pm 0.69 \mu\text{m}$  (promedio  $\pm$  DS) y un flagelo largo ( $43.24 \pm 7.99 \mu\text{m}$ ). El espermatozoides fresco permanece viable y motil por más de cinco horas después de ser liberado de las bolsas gaméticas. Todos los componentes evaluados después de descongelado el espermatozoides (morfología, motilidad y viabilidad) no mostraron diferencias significativas con el espermatozoides fresco. Este estudio es el primer registro de criopreservación para el espermatozoides de *O. faveolata*; sin embargo, es necesario realizar más investigaciones con el fin de incrementar el éxito del protocolo de criopreservación para que este pueda ser aplicado a mayor escala.

**PALABRAS CLAVE:** *Orbicella faveolata*, Parque Nacional Natural Tayrona, Reproducción sexual, Gametos de coral, Morfología.

#### ABSTRACT

Cryopreservation has been recently applied to coral gametes and tissue with successful results that can be applied for different purposes on coral conservation and restoration. In this study, we decided to determine the sperm morphology of the coral *Orbicella faveolata* and assess the feasibility of sperm cryopreservation using a combination of intracellular (1,2-Propadiol) and extracellular (milk) cryoprotectants, and two frozen treatments for 24 h. Mature spermatozoa had a triangular-like head shape measuring  $4.10 \pm 0.69 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  SD) and long flagellum ( $43.24 \pm 7.99 \mu\text{m}$ ). Fresh sperm remained viable and mobile for more than five hours after being released from the gamete bundles. After cryopreservation, all post-thaw sperm components assessed (morphology, motility and viability) showed no difference in contrast to fresh sperm. This study is the first report of cryopreservation of *O. faveolata* sperm, however further research is needed to increase the success of the cryopreservation protocol for broad-scale application.

**KEYWORDS:** *Orbicella faveolata*, Sexual reproduction, Coral gametes, Morphology, Tayrona National Natural Park.

## INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral son los ecosistemas marinos más complejos y productivos (Grigg *et al.*, 1984; Díaz *et al.*, 1996). Se ha comparado su biodiversidad con la de las selvas tropicales (Connell, 1978), y se han denominado ‘oasis del mar profundo’ debido a su alta productividad (Hoegh-Guldberg, 1999). Desafortunadamente, durante las últimas décadas los arrecifes de coral han experimentado cambios importantes en todo el mundo. Varias amenazas naturales y humanas, como el cambio climático global, el blanqueamiento de corales y las enfermedades contribuyen a su degradación y destrucción (Goldberg y Wilkinson, 2004). Aunque la vulnerabilidad y resistencia de los arrecifes varían en función de muchos factores -como las diferentes especies y las respuestas específicas de la población (Rowan *et al.*, 1977) -la mayoría de los arrecifes de coral presentan cambios en la composición de las comunidades de corales (Reaser *et al.*, 2000), habiendo desaparecido en algunos casos, tanto la estructura de los arrecifes como las comunidades marinas (Graham *et al.*, 2006). En consecuencia, se han visto afectadas las comunidades humanas que viven de estos ecosistemas (Wilkinson, 1999).

Se han desarrollado diferentes estrategias de conservación de corales, incluyendo métodos de conservación *in situ*, que incluyen el diseño y establecimiento de Áreas Marinas Protegidas (Carr, 2000), la administración de las mismas, así como políticas regulatorias y económicas (White y Courtney, 2004), y también los métodos de restauración ecológica (Edwards, 2010). Sin embargo, la interacción entre las amenazas globales y locales requiere métodos de conservación *ex situ* para mantener y asegurar el futuro de los arrecifes de coral. Los métodos *ex situ* incluyen diferentes sistemas, como el uso de viveros terrestres para la crianza asexual de corales, la cría de larvas de coral y reclutas hasta juveniles (Rinkevich, 2005; Edwards, 2010), y la conservación de muestras biológicas en bancos de criopreservación (Hagedorn *et al.*, 2010). Esta última es una herramienta efectiva de conservación donde las células se congelan en compuestos parecidos a los azúcares llamados crioprotectores (Hagedorn y Spindler, 2014). Estas sustancias preservan las estructuras celulares intactas durante el proceso de congelación (Pegg, 2007) y las temperaturas de congelación estabilizan las condiciones que ayudan a preservar los tejidos vivos durante décadas (Hagedorn y Spindler, 2014).

La criopreservación de gametos ya ha sido utilizada como una forma efectiva de asegurar el mantenimiento de la diversidad genética de muchas especies de vida silvestre, incluidos los hurones, antílopes (Wolf *et al.*, 2001; Wildt *et al.*, 2010), y también los invertebrados marinos como las ostras y los erizos de mar (Gakhova *et al.*, 1988; Paniagua-Chaves

## INTRODUCTION

Coral reefs are the most complex and productive of all marine ecosystems (Grigg *et al.*, 1984; Díaz *et al.*, 1996). Their biodiversity has been compared to that found in tropical rain forests (Connell, 1978), and have been called ‘oases of the sea’ due to their high productivity (Hoegh-Guldberg, 1999). Unfortunately, during recent decades, coral reefs have undergone major changes worldwide. Several nature- and human-based threats such as global climate change, coral bleaching and diseases contribute to their degradation and destruction (Goldberg and Wilkinson, 2004). Although reef vulnerability and resilience vary in relation to many factors including different species and population-specific responses (Rowan *et al.*, 1977), most coral reefs show changes on community composition (Reaser *et al.*, 2000), and even in some cases both reef structures and marine communities have collapsed (Graham *et al.*, 2006). Consequently, human communities living off these ecosystems have been affected (Wilkinson, 1999).

Different coral conservation strategies have been developed, including *in situ* conservation practices, which comprise the design and implementation of effective Marine Protected Areas (Carr, 2000), governance, and regulatory and economic policies (White and Courtney, 2004), as well as ecological restoration methods (Edwards, 2010). However, the interaction of global and local threats calls for *ex situ* conservation practices to maintain and secure the future of coral reefs. *Ex situ* practices includes different approaches such as the use of on land nurseries for asexual rearing of corals, rearing coral larvae and recruits to juveniles (Rinkevich, 2005; Edwards, 2010) and the preservation of biological samples in frozen banks by cryopreservation (Hagedorn *et al.*, 2010). The latter is an effective conservation tool where cells are frozen in sugar-like compounds called cryoprotectants (Hagedorn and Spindler, 2014). These substances preserve the cell structures intact during the freezing process (Pegg, 2007), while the freezing temperatures stabilize conditions preserving living tissues for decades (Hagedorn and Spindler, 2014).

Gamete cryopreservation has already acted as an effective insurance policy to maintain the genetic diversity of many wildlife species including ferrets, antelopes (Wolf *et al.*, 2001; Wildt *et al.*, 2010) and also marine invertebrates as oysters and sea urchins (Gakhova

y Tiersch, 2001). Las células que han sido criopreservadas y almacenadas en bancos de criopreservación de forma adecuada pueden permanecer viables durante años sin daño en el ADN (Hagedorn *et al.*, 2012). Sin embargo, el uso de estos bancos de criopreservación es nuevo para las especies de corales (Hagedorn *et al.*, 2012) y se espera que sirva para preservar las especies existentes y la diversidad genética como parte de los procesos de rehabilitación. La criopreservación de espermatozoides se ha aplicado con éxito en algunas especies de corales, incluyendo *Acropora palmata* (del Caribe), *A. millepora*, *A. tenuis*, *A. loripes*, *Fungia scutaria*, *Platygyra lamolina*, *P. daedalea* y *Goniastrea aspera* (Hagedorn *et al.*, 2006; Hagedorn y Spindler, 2014). Aún no se ha conseguido lograr el éxito de la criopreservación con ninguna larva de coral u ovocitos (Hagedorn y Spindler, 2014).

Como la mayoría de las áreas de arrecifes de coral del Caribe, la salud de los arrecifes de coral colombianos y los servicios de los ecosistemas están disminuyendo. Entre 2010 y 2013, tres instituciones colombianas (Universidad Jorge Tadeo Lozano, Calipso Dive Center y el Parque Nacional Natural Tayrona) se unieron para desarrollar proyectos de restauración de arrecifes de coral. Este estudio forma parte de este esfuerzo y su objetivo es describir la morfología espermática del coral formador de arrecifes en el Caribe *Orbicella faveolata*, y evaluar la funcionalidad de los gametos en cuanto a su motilidad y vitalidad después de dos tratamientos diferentes de criopreservación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de esperma

Se colectó el esperma de coral durante el evento de desove del 6 de septiembre de 2012 en la bahía de Gayraca (Parque Nacional Natural Tayrona–Colombia), de cinco colonias del coral formador de arrecifes *O. faveolata*. Esta especie es hermafrodita con fertilización externa, liberando sólo durante una noche al año paquetes de gametos que contienen tanto huevos como espermatozoides (Levitan *et al.*, 2011). Estos paquetes tienen una alta flotabilidad, lo que permitió su recolección mediante el uso de redes modificadas (Vermeij *et al.*, 2003). Los paquetes de gametos se colectaron de las trampas de malla y se transportaron a tierra, donde se agitaron suavemente hasta separar los espermatozoides de los huevos usando agua de mar esterilizada y una malla de plancton de 60 mm.

### Evaluación de la morfología y motilidad espermática

La morfología y calidad espermática se determinó de acuerdo con los métodos de Rurangwa *et al.* (2004) y Gaitán-Espitia *et al.* (2013). Para describir la morfología

*et al.*, 1988; Paniagua-Chaves and Tiersch, 2001). Cells that are cryopreserved and banked properly can retain viability for years without DNA damage (Hagedorn *et al.*, 2012). However, the use of these frozen banks is new for coral species (Hagedorn *et al.*, 2012), and is expected to secure existing species and genetic diversity as part of rehabilitation processes. Sperm cryopreservation has been successfully applied in some species of corals, including *Acropora palmata* (from the Caribbean), *A. millepora*, *A. tenuis*, *A. loripes*, *Fungia scutaria*, *Platygyra lamolina*, *P. daedalea* and *Goniastrea aspera* (Hagedorn *et al.*, 2006; Hagedorn and Spindler, 2014). No coral larvae and eggs have yet been successfully cryopreserved (Hagedorn and Spindler, 2014).

As most Caribbean coral reef areas, Colombian coral reefs health and ecosystem services are decreasing. Between 2010 and 2013, three Colombian institutions (Universidad Jorge Tadeo Lozano, Calipso Dive Center and Tayrona National Natural Park Authority) joined their work towards coral reef restoration projects. This study was part of this effort, and aim to describe the spermatozoa morphology on the Caribbean reef building coral *Orbicella faveolata* and to assess gamete performance in terms of motility and vitality after two different cryopreservation treatments.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of sperm

Coral sperm was collected during the spawning event of September 6<sup>th</sup>, 2012 at Gayraca Bay (Tayrona National Natural Park – Colombia), from five colonies of the reef builder coral *O. faveolata*. This species is hermaphroditic and has external fertilization, releasing one night per year gamete bundles that contain both eggs and sperm (Levitan *et al.*, 2011). These bundles are highly buoyant and therefore their collection was done using modified net traps (Vermeij *et al.*, 2003). Gamete bundles were obtained from net traps, transported to land where they were gently agitated until separate sperm from eggs using sterilized seawater and a 60 mm plankton mesh.

### Assessment of sperm morphology and motility

The morphology and quality of the sperm were characterized following methods by Rurangwa *et al.* (2004) and Gaitán-Espitia *et al.* (2013). To describe sperm morphology one drop of sperm was placed on

espermática, se colocó una gota del esperma en un portaobjetos de microscopio y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio. Se obtuvieron imágenes digitales (n=10) utilizando un microscopio (Nikon Eclipse E200) con cámara digital (Nikon Digital Sight DS-Fi1). Se analizaron las imágenes con el programa Image J (Abramoff *et al.*, 2004) para medir la longitud de la cabeza y del flagelo de los espermatozoides. Se observó el esperma al microscopio (aumento de 100x), evaluando tanto la duración como la viabilidad de la motilidad espermática. La duración de la motilidad se definió como el período de tiempo transcurrido hasta el cese de cualquier movimiento. La viabilidad espermática, definida como el porcentaje de espermatozoides vivos, se determinó utilizando el método eosina-nigrosina (Rose y Heath, 1978), cuantificando todos los espermatozoides vivos y muertos. Se preparó un frotis mezclando una gota de esperma de coral con una gota de eosina: nigrosina (1:1) en cada uno de los cinco portaobjetos. Después de secarlos al aire, se examinaron los portaobjetos con un aumento de 100x (Nikon Eclipse E200). Los espermatozoides vivos no se tiñeron (sin color), mientras que las células muertas se tiñeron de rojo. Se realizó una evaluación de la movilidad y viabilidad espermática cada dos horas. Después de seis horas, los espermatozoides dejaron de moverse, aunque seguían vivos, y la última evaluación se realizó ocho horas después de la liberación de esperma de los paquetes de gametos, considerando que ya no se cumplían las condiciones de viabilidad.

### Ensayos de criopreservación

El crioprotector utilizado en los ensayos consistió en una solución de 1,2-propanodiol, leche en polvo y Ringer-C (modificado de Gaitán-Espitia *et al.*, 2013). Se mezcló este crioprotector con esperma de coral en una proporción de 1:10 respectivamente y se dejó equilibrar durante 20 minutos aproximadamente (Gaitán-Espitia *et al.*, 2013). Se llenaron un total de 20 pajillas de 0.5 ml con la mezcla y se dividieron en dos grupos para los ensayos de criopreservación: el primer grupo se almacenó a 4 °C (criopreservación lenta) y el segundo en nitrógeno líquido a -196 °C. (criopreservación rápida), ambos durante 24 h. Para determinar el éxito de estos ensayos y las diferencias entre los mismos, se descongelaron todas las pajillas en un baño de agua a 37 °C hasta que el medio líquido se hizo visible (González y Díaz, 2001; Gaitán-Espitia *et al.*, 2013). Inmediatamente después de la descongelación se retiró una parte del esperma criopreservado (aproximadamente 5 µL), la cual se colocó en un portaobjetos de microscopio y se observó a 100 aumentos. Se midieron tanto la motilidad como la vitalidad espermática. Para determinar si la criopreservación

a microscope slide and covered with a glass coverslip. Digital images (n=10) were obtained using a digital camera (Nikon digital sight DS-Fi1) attached to a microscope (Nikon eclipse E200). These images were analyzed using software-free Image J (Abramoff *et al.*, 2004) to measure the length of the head and the flagellum of the spermatozoa. Sperm was observed under the microscope (100x magnification) and spermatozoa motility duration and viability were assessed. Motility duration was defined as the time period leading to cessation of any movement. Sperm viability, defined as the percentage of living sperm cells, was determined using the eosin-nigrosin method (Rose and Heath, 1978), all live and dead sperm cells were quantified. A smear was prepared by mixing one drop of coral sperm with one drop of eosin:nigrosin (1:1) in each of five slides. After being air-dried, these slides were examined under x100 magnification (Nikon eclipse E200). Alive spermatozoa did not stain (uncolored), while dead cells stained red. Sperm motility and viability were assessed every two hours. After 6 hours sperm stop moving but still alive, and the last assessment were made 8 hours after sperm released from gamete bundles considering that it no longer fulfilled the viability conditions.

### Cryopreservation assays

The cryoprotectant used in the assays consisted of a solution of 1,2-propadiol, powdered milk and ringer-C (modified from Gaitán-Espitia *et al.*, 2013). This cryoprotectant was mixed with coral sperm in a 1:10 proportion respectively and allowed to equilibrate for 20 minutes approximately (Gaitán-Espitia *et al.*, 2013). A total of 20 French straws of 0.5 ml were filled with the mix and divided in two groups for the cryopreservation essays: the first group was stored at 4° C (slow cryopreservation treatment) and the second group in liquid nitrogen at -196°C (fast cryopreservation treatment), both for 24 h. To determinate the success of these assays and the differences between them, all straws were thawed in a water bath at 37° C until the liquid medium was visible (González and Díaz, 2001; Gaitán-Espitia *et al.*, 2013). Immediately after thawing, part of the cryopreserved sperm (about 5 mL) was removed, placed on a microscope slide and observed under 100x magnification. Both sperm motility and vitality were measured. To find if the cryopreservation had any effect

tuvo algún efecto sobre la motilidad y la vitalidad espermática del coral, se construyó una tabla de contingencia y se realizó una prueba de independencia Chi-cuadrado. Estos análisis permitieron la comparación entre los ensayos de criopreservación. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATGRAPHICS 5.0 (Moreno-Gil, 1998).

## RESULTADOS

### Morfología, motilidad y vitalidad espermática

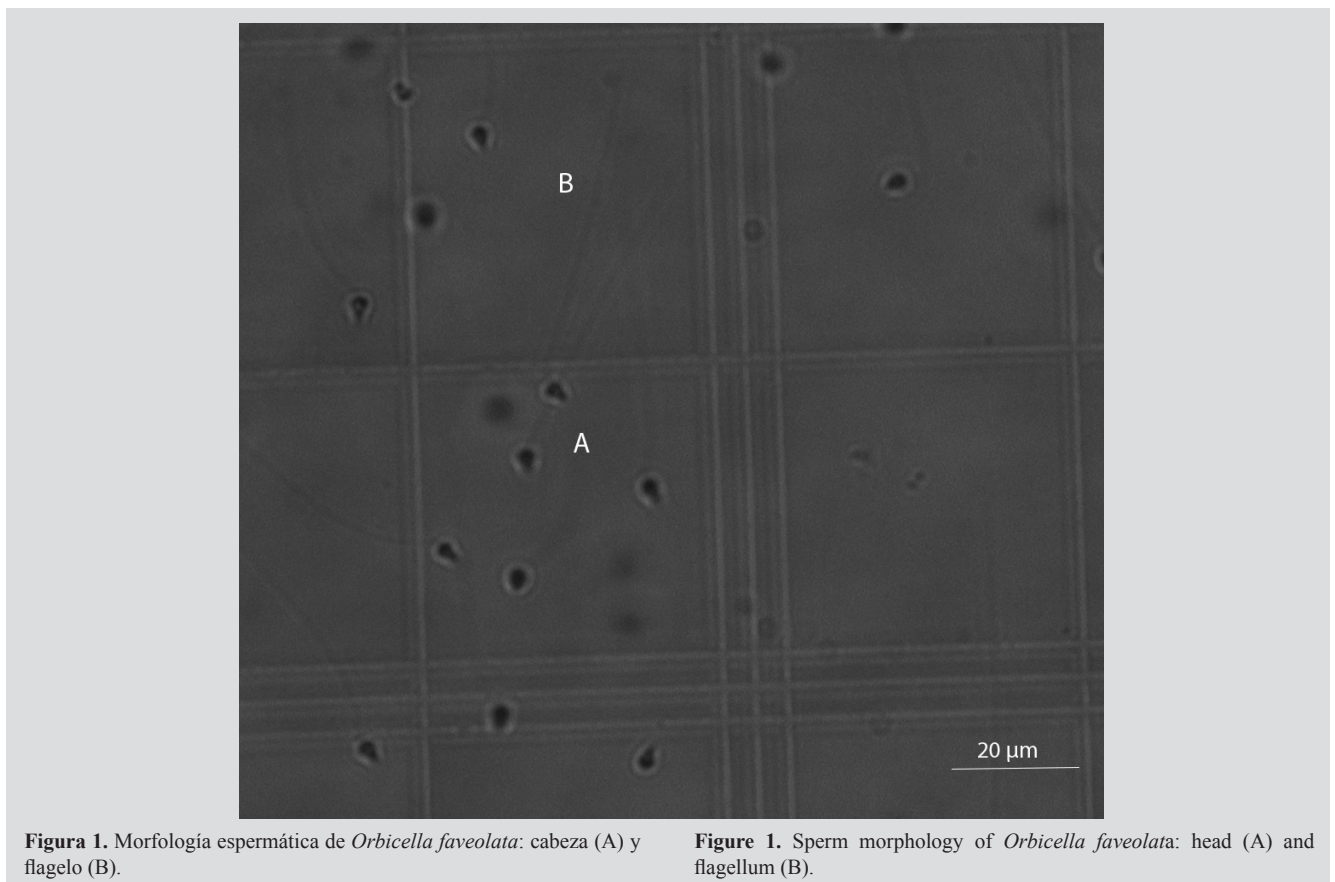
Los espermatozoides de *Orbicella faveolata* tienen cabezas con forma de pala y colas largas (Figura 1). Los espermatozoides maduros tenían una longitud media de flagelo de  $43.24 \pm 7.99 \mu\text{m}$  (media  $\pm$  DE), y una longitud media de la cabeza de  $4.10 \pm 0.69 \mu\text{m}$  (se midieron  $N=40$  espermatozoides). La densidad espermática fue de  $8.58 \times 10^6$  espermatozoides  $\text{ml}^{-1}$ .

on the motility and the vitality of the coral sperm, a contingency table was built, and a Chi-square-test of independence was performed. These analyses allowed the comparison between cryopreservation essays. All statistical analysis were performed with the software STATGRAPHICS 5.0 (Moreno-Gil, 1998).

## RESULTS

### Sperm morphology, motility and vitality

*Orbicella faveolata* sperm have spade shape heads and long tails (Figure 1). Mature spermatozoa had a mean flagellum length of  $43.24 \pm 7.99 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  SD), and a mean head length of  $4.10 \pm 0.69 \mu\text{m}$  ( $N=40$  spermatozoa were measured). Sperm density was  $8.58 \times 10^6$  spermatozoa  $\text{ml}^{-1}$ .



**Figura 1.** Morfología espermática de *Orbicella faveolata*: cabeza (A) y flagelo (B).

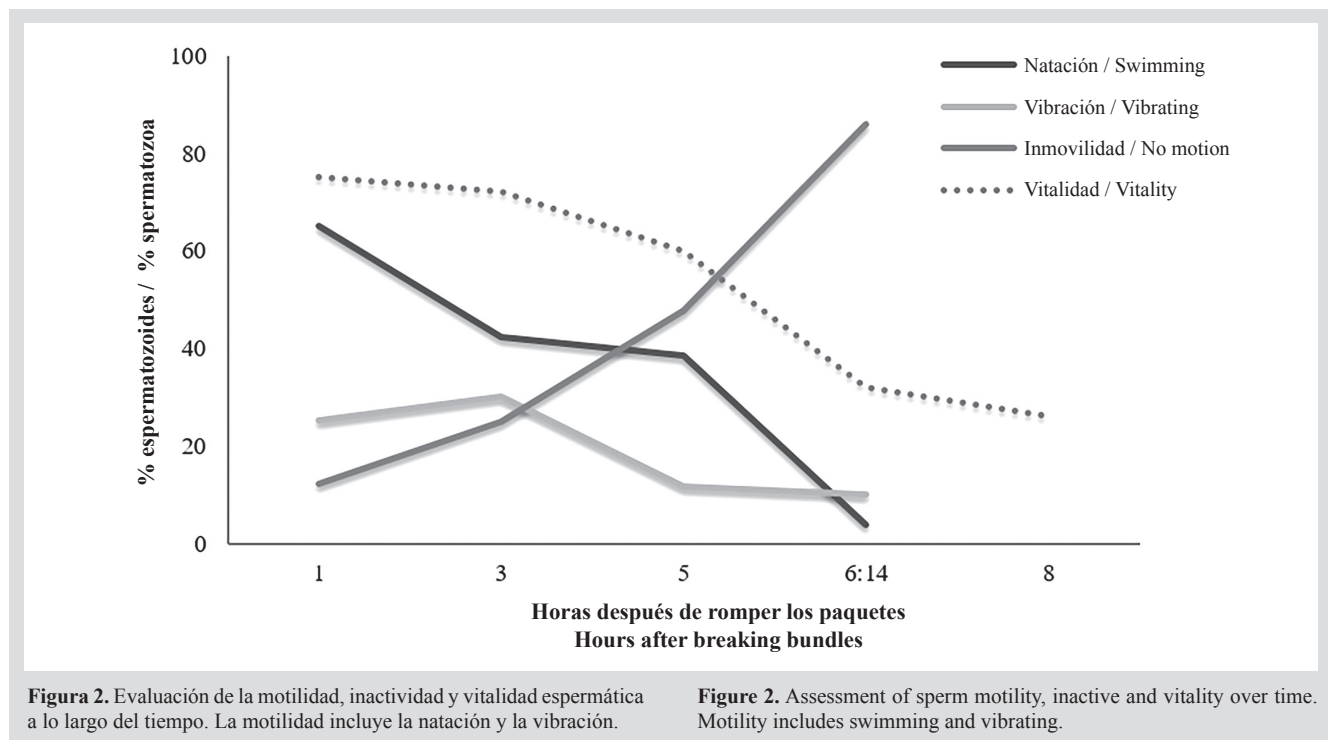
**Figure 1.** Sperm morphology of *Orbicella faveolata*: head (A) and flagellum (B).

Después de ser liberados de los paquetes de gametos, la motilidad espermática era del 90%; como se esperaba, ésta disminuyó con el tiempo y el último movimiento se observó en menos del 15% de los espermatozoides después de 6 h

After being released from the gamete bundles, 90% of the sperm had motility; as expected, sperm motility decreased over time and the last movement was observed on less of 15% of sperm after 6 h and 14 min of

y 14 min de romper los paquetes de gametos. La motilidad espermática en fresco varió desde la natación ( $65.0 \pm 1.26\%$ ) hasta la vibración (movimiento de látigo,  $23.5 \pm 1.29\%$ ), y  $12.3 \pm 1.43\%$  se mantuvieron inmóviles. Tres horas después de romper los paquetes de gametos,  $42.3 \pm 1.01\%$  nadaban,  $30.1 \pm 0.91\%$  vibraban y  $25.1 \pm 1.26\%$  estaban inmóviles. Después de cinco horas,  $38.6 \pm 1.29\%$  vibraban,  $11.8 \pm 0.34\%$  nadaban, y  $47.9 \pm 2.80\%$  estaban inmóviles. Aunque la viabilidad espermática también disminuyó con el tiempo, su reducción fue menor que la de la motilidad. Los espermatozoides vivos del esperma fresco fueron  $75\%$ , y después de cinco horas alrededor de  $60\%$ , disminuyendo a menos de  $30\%$  después de ocho horas (Figura 2).

breaking the gamete bundles. Fresh sperm motility varied from swimming ( $65.0 \pm 1.26\%$ ) to vibrating (whip-like motion;  $23.5 \pm 1.29\%$ ) and,  $12.3 \pm 1.43\%$  was inactive (no motile). Three hours after breaking the gamete bundles  $42.3 \pm 1.01\%$  were swimming,  $30.1 \pm 0.91\%$  vibrating, and  $25.1 \pm 1.26\%$  inactive. After five hours  $38.6 \pm 1.29\%$  were vibrating,  $11.8 \pm 0.34\%$  swimming, and  $47.9 \pm 2.80\%$  inactive. Although sperm viability decreased with time as well, its reduction was less pronounced than its motility. Alive spermatozoa in fresh sperm were  $75\%$ , and after five hours around  $60\%$ , declining to less than  $30\%$  after eight hours (Figure 2).

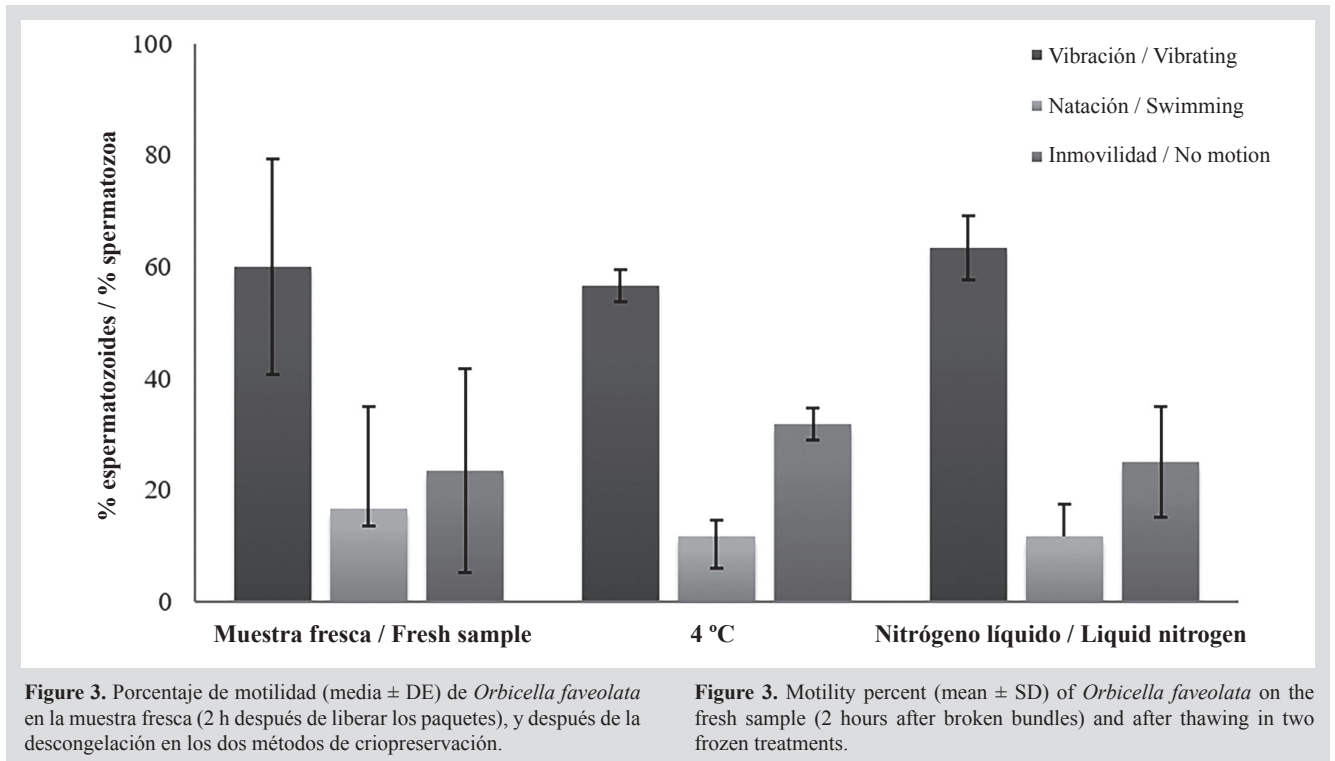


### Ensayos de criopreservación

Aunque hubo una ligera disminución de la capacidad natatoria de los espermatozoides, no se encontraron diferencias estadísticas entre el esperma fresco y ambos tratamientos para la motilidad y vitalidad de los espermatozoides criopreservados ( $X^2=2.92$ ,  $p=0.572$ ;  $X^2=1.69$ ,  $p=0.428$ , respectivamente, Figura 3). Después de 24 h,  $70\%$  de los espermatozoides de la criopreservación lenta ( $4^\circ\text{C}$ ) presentaban motilidad y viabilidad, mientras que los espermatozoides de la criopreservación rápida (nitrógeno líquido) tuvieron una vitalidad promedio de  $55\%$  y una motilidad promedio de  $75\%$  después 24 h. No se observaron cambios en la morfología espermática dentro de los tratamientos.

### Cryopreservation assays

Although there was a slight decrease in the sperm swimming abilities, no statistical differences were found between fresh sperm and both treatments for cryopreserved sperm motility and vitality ( $X^2=2.92$ ,  $p=0.572$ ;  $X^2=1.69$ ,  $p=0.428$  respectively, Figure 3). After 24 h, the sperm from the slow cryopreservation treatment ( $4^\circ\text{C}$ ) was  $70\%$  viable and moving, while the sperm exposed to the quick cryopreservation (liquid nitrogen) treatment had a vitality average of  $55\%$  and motility average of  $75\%$  after 24 h. No changes in the sperm morphology were observed within the treatments.



## DISCUSIÓN

En este estudio se describe la morfología espermática del coral *Orbicella faveolata* y dos métodos de criopreservación (a 4 °C y en nitrógeno líquido) para preservar con éxito los espermatozoides durante 24 h, manteniendo al menos 70% de la motilidad y vitalidad espermática después de la descongelación. Este es el primer estudio sobre la criopreservación del espermatozoide de *O. faveolata*.

La cabeza triangular del espermatozoide de *O. faveolata* es común en muchos invertebrados marinos como los erizos de mar (Landry *et al.*, 2003). En el caso concreto de los corales, se han descrito dos formas diferentes de cabeza de los espermatozoides: cabeza piriforme y cabeza cónica alargada (Harrison y Wallace, 1990). La cabeza de los espermatozoides de *O. faveolata* se asemeja a la segunda forma mencionada. De acuerdo con la descripción de Harrison y Wallace (1990), el proceso anterior localizado en la cabeza de los espermatozoides podría tener una función acrosómica, aunque nunca se ha sido estudiado este aspecto. Aunque las diferencias en la longitud de la cabeza podrían ser una característica taxonómica específica de la especie, y ser utilizadas para identificar los clados genéticos (Briones *et al.*, 2012), no existen datos sobre *O. faveolata* u otros orbicélidos para comparar. Los datos de los que se dispone

## DISCUSSION

In this study, we describe the spermatozoa morphology of the coral *Orbicella faveolata* as well as two cryopreservation methods (at 4 °C and in liquid nitrogen) used to successfully preserve sperm for 24 h, maintaining at least 70% of sperm motility and vitality after thawing. This is the first study on *O. faveolata* sperm cryopreservation.

The observed triangular-like head shape sperm observed for *O. faveolata* is common in many marine invertebrates such as sea urchins (Landry *et al.*, 2003). Specifically for corals, two different spermatozoa head shapes have been previously described: pear-shaped and elongated conical head (Harrison and Wallace, 1990). *O. faveolata* spermatozoa shape resembles the second one. As described by Harrison and Wallace (1990), the anterior process located on the spermatozoa head could have an acrosomal function; however, this has never been studied. Although differences in head length could be a species-specific taxonomic trait and be used to identify genetic clades (Briones *et al.*, 2012), there is no data for *O. faveolata* or other Orbicellids for comparisons. Available data from Albright (2011), who measured the *O. faveolata* head area using scanning electron micrographs, could not be used for comparison due to the difference on the resolution between images.

de Albright (2011), que midieron el área de la cabeza de *O. faveolata* utilizando micrografía electrónica de barrido, no se pudieron usar para la comparación debido a la diferencia en la resolución de las imágenes.

La limitación de espermatozoides, definida como la dilución de espermatozoides en agua de mar (Yund, 2000), es un factor clave que limita el éxito reproductivo de los invertebrados sésiles de desove masivo (Levitan *et al.*, 1992; Oliver y Babcock, 1992). Para maximizar el éxito de la fertilización y, por lo tanto, la reproducción, han desarrollado múltiples estrategias (Yund, 2000). Algunas de estas estrategias en los corales de desove masivo son la sincronización del desove (Harrison, 2011), los gametos flotantes (Oliver y Babcock, 1992), y la morfología y longevidad específicas de los espermatozoides (Benzie y Dixon, 1994). Las colonias de *O. faveolata* tienen desoves sincrónicos y los paquetes de espermatozoides y óvulos tienen flotabilidad positiva. Las interacciones de los gametos están controladas por atributos tales como el tamaño del óvulo, la capacidad de nadar de los espermatozoides, y la probabilidad de que la fusión del espermatozoide y el óvulo produzca la fertilización (Levitan y Petersen, 1995). Los flagelos largos de los espermatozoides se asocian con una mayor velocidad de natación y mayores distancias recorridas, lo que es muy importante para el éxito de la fertilización (Fitzpatrick *et al.*, 2010). En otras especies de invertebrados marinos como el erizo de mar negro, *Diadema antillarum*, se ha medido que la disponibilidad de espermatozoides y la proximidad entre el macho y la hembra durante los desoves influyen en el éxito de la fertilización (Levitan, 1991).

La longevidad de los espermatozoides en los invertebrados marinos con desove libre varía de pocas horas a días y, además de ser característica de la especie, depende de la concentración, la temperatura y el contacto con el óvulo (Jhonson y Yun, 2004). Nuestros resultados muestran que más de 50% de los espermatozoides pueden mantenerse vivos y móviles durante seis horas después de ser liberados. Este factor podría desempeñar un papel importante en el éxito reproductivo de *O. faveolata* a pesar de la dilución del agua de mar (Jhonson y Yun, 2004). En general, se ha supuesto que la dilución de espermatozoides en el agua reduce la longevidad de los espermatozoides en decenas de minutos (Levitan, 1991); sin embargo, nuestros resultados muestran que es posible que el espermatozoide de *O. faveolata* permanezca viable durante largos periodos de tiempo a pesar de la dilución del agua de mar, lo que aumenta las posibilidades de fertilización de los óvulos de colonias aisladas.

Para varios invertebrados marinos, incluidas algunas especies de coral del género *Acropora*, la motilidad espermática

Sperm limitation, defined as the dilution of sperm in seawater (Yund, 2000), is one of the key factors limiting reproductive success of sessile broadcast-spawning invertebrates (Levitan *et al.*, 1992; Oliver and Babcock, 1992). To maximize the success of fertilization and hence reproduction, multiple strategies have evolved (Yund, 2000). Some of these strategies in broadcasting corals are spawning synchrony (Harrison, 2011), floating gametes (Oliver and Babcock, 1992), and specific sperm morphology and longevity (Benzie and Dixon, 1994). *O. faveolata* colonies have simultaneous spawning events, and both egg and sperm bundles are positively buoyant. Gamete interactions are controlled by attributes like egg size, sperm swimming ability, and how likely a sperm-egg collision is to result in fertilization (Levitan and Petersen, 1995). Long spermatozoa flagella are associated to higher swimming speed and longer distances traveled, which is highly important for fertilization success (Fitzpatrick *et al.*, 2010). In other species of marine invertebrates as the black sea urchin, *Diadema antillarum*, has been measured that sperm availability and proximity between male and female during the spawn events affects the fertilization success (Levitan, 1991).

Sperm longevity in free-spawning marine invertebrates varies from few hours to days and, besides being species specific depends on concentration, temperature and egg contact (Jhonson and Yun, 2004). Our results shown than more than 50% of the spermatozoa can stay alive and mobile for six hours after being released. This factor could play an important part in the reproductive success of *O. faveolata* despite ocean dilution (Jhonson and Yun, 2004). It has been generally assumed that dilution of sperm in the water reduced sperm longevity in tens of minutes (Levitan, 1991); however, our results show that it is possible that *O. faveolata* sperm remains viable for long times despite seawater dilution, increasing the chances of fertilizing eggs from isolated colonies.

For several marine invertebrates, including some coral species of the genera *Acropora*, sperm motility initiates in response to specific chemical cues secreted by the eggs (Morisawa, 1994; Yoshida *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2006). Specifically, for three species of *Acropora* from the Pacific, sperm movement was initiated in the presence of eggs at 150-300 mm distance when pH was increased by adding choline chloride (Na-free artificial seawater containing  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) to the artificial seawater



se inicia en respuesta a señales químicas específicas secretadas por los óvulos (Morisawa, 1994; Yoshida *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2006). Específicamente, para tres especies de *Acropora* del Pacífico, la motilidad espermática se inició en presencia de los óvulos a 150-300 mm de distancia cuando se incrementó el pH agregando cloruro de colina (agua de mar artificial libre de Na que contiene  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) al agua de mar artificial (Morita *et al.*, 2006). Estos autores argumentan que la regulación espermática es modulada por las secreciones de los óvulos, las cuales juegan un papel importante en el éxito de la fertilización. Como *Acropora* spp., el complejo de especies de *Orbicella annularis* tiene tiempos de desove similares (Fukami *et al.*, 2004): sin embargo, en este estudio, se observó la motilidad espermática en *O. faveolata* desde el principio cuando los gametos fueron separados y los óvulos no estaban presentes en las muestras. Por lo tanto, como la regulación espermática está modulada por las secreciones de los óvulos, es posible que algunas de éstas se hayan lavado junto con los espermatozoides durante la separación o que el compuesto químico que induce la motilidad espermática en esta especie se encuentre en el agua de mar. Este aspecto debe ser estudiado más a fondo.

Los ensayos de criopreservación del esperma de *O. faveolata* tuvieron éxito; los espermatozoides sometidos a criopreservación lenta tuvieron una motilidad promedio después de la descongelación del 70%, y aquellos sometidos a criopreservación rápida de 75%. En ambos tratamientos, la morfología espermática no cambió. En comparación, Hagedorn *et al.* (2006) obtuvieron una motilidad espermática posterior a la descongelación superior a 95% después del almacenamiento, pero registraron un cambio en la morfología espermática tanto en el diámetro de la cabeza como en la longitud de la cola. Parece que estos cambios fueron el resultado del crioprotector utilizado. Todos los crioprotectores son tóxicos o letales para los espermatozoides, especialmente a altas concentraciones. En nuestro estudio, la ausencia de cambios en la morfología espermática podría ser el resultado de la combinación de un crioprotector intracelular (1,2-Propanodiol) y otro extracelular (leche). El intracelular podría proporcionar una protección inicial contra la formación de hielo intracelular (Gaitán-Espitia *et al.*, 2013) y el contenido de lípidos de la leche puede estabilizar las membranas celulares durante los procesos de congelación-descongelación (Odintsova y Boroda, 2012).

Aunque evaluamos la funcionalidad espermática en términos de motilidad y vitalidad, el siguiente desafío consiste en determinar el éxito de la fertilización espermática después de la criogenización. Se ha utilizado el esperma congelado-

(Morita *et al.*, 2006). These authors argue that sperm regulatory mechanisms are modulated by egg secretions which play an important role in the fertilization success. As *Acropora* spp., the *Orbicella annularis* species complex has similar spawning times (Fukami *et al.*, 2004): nevertheless, in this study sperm motility in *O. faveolata* was observed from the beginning when gametes were separated and eggs were absent in the samples. Thus, as sperm regulatory mechanisms are modulated by egg secretions, it is possible that some of the egg secretions were washed with the sperm during separation or that the chemical inducing sperm movement for this species is present in the seawater. This aspect must be further studied.

*Orbicella faveolata* sperm cryopreservation assays were successful; the sperm exposed to the slow cryopreservation treatment had a post thaw average motility of 70%, and the one exposed to quick cryopreservation treatment had a motility of 75%. In both treatments, sperm morphology did not change. In comparison, Hagedorn *et al.* (2006) obtained a post-thaw sperm motility of >95% after storage but noticed a change in the morphology of the sperm in both the head diameter and tail length. It seems that these changes were a result of the cryoprotectant used. All cryoprotectants are toxic or lethal to sperm cells, especially at high concentrations. In our study, the absence of sperm morphology changes could be the result of combining intracellular (1,2-Propadiol) and extracellular (milk) cryoprotectant. The extracellular could provide an initial protection against the formation of intracellular ice (Gaitán-Espitia *et al.*, 2013) and the milk's lipid content may stabilize cell membranes during freeze-thaw processes (Odintsova and Boroda, 2012).

Although we assessed sperm performance in terms of motility and vitality, the next challenge is determining fertilization success of the sperm after cryogenic preservation. Frozen-thawed sperm from different species of corals have been used to fertilize conspecific egg released in the same spawn and from successive spawns, reaching fertilization success of 60%, and resulting in functioning larvae (Hagedorn *et al.*, 2012). Moreover, in preliminary experiments on *A. clathrata*, larvae produced from frozen-thawed sperm developed, settled and assimilated symbionts creating new corals in vitro (Hagedorn and Spindler, 2014).

All cryopreservation methods in coral have been

descongelado de diferentes especies de corales para fertilizar óvulos conespecíficos liberados en el mismo y sucesivos desoves, alcanzando un éxito de fertilización de 60% y dando como resultado larvas funcionales (Hagedorn *et al.*, 2012). Además, en experimentos preliminares sobre *A. clathrata*, las larvas producidas a partir de esperma congelado-descongelado se desarrollaron, asentaron y asimilaron simbiontes, creando nuevos corales in vitro (Hagedorn y Spindler, 2014).

Todos los métodos de criopreservación en coral se han aplicado con éxito a los espermatozoides, pero no a los óvulos de coral que aún no se han criopreservado con éxito. Una de las razones principales es la sensibilidad de los óvulos a la disminución de temperatura (Hagedorn y Spindler, 2014) que influye en las propiedades, función e integridad de la membrana celular (Lin y Tsai, 2012). Se obtuvieron resultados similares al evaluar la criopreservación de óvulos de *O. faveolata*, después de que los procesos de congelación-descongelación desintegraran todos los óvulos.

Este trabajo sustenta el de Hagedorn *et al.* (2006, 2012) al pedir el desarrollo de protocolos de criopreservación que puedan utilizarse para crear un banco de criobiología para preservar las especies de coral existentes y su diversidad genética. Hoy en día, existen tres criobancos a largo plazo en el mundo donde se almacenan células de coral, dos de ellas ubicados en EE.UU. -en el Instituto Smithsonian/Instituto de Biología Marina de Hawái y el Programa de Germoplasma Animal del Departamento de Agricultura de EE. UU. - y uno en Australia en el Zoológico Taronga Western Plains (Hagedorn y Spindler, 2014). La criopreservación de gametos de coral podría desempeñar un papel importante en la restauración coralina en el futuro inmediato y también contribuir a expandir los viveros de corales mediante la inclusión de corales de reproducción sexual (Hagedorn y Spindler, 2014) que, como *O. faveolata*, sólo lo hacen una vez al año.

Se necesitan más estudios sobre las técnicas de criopreservación de coral, el éxito de la fertilización y el desarrollo de larvas y reclutas después de la criopreservación. El uso de técnicas de criopreservación de esperma, como la evaluada en este estudio, puede ayudar a preservar la diversidad genética, prevenir la desaparición de los corales y crear oportunidades para diversificar unas poblaciones cada vez más pequeñas, evitando la pérdida natural de heterocigosidad debido a la deriva genética (Hagedorn y Spindler, 2014). Además, permite avanzar en la investigación sobre la biología del desarrollo, la genética, la sistemática y la biología molecular de los corales.

successfully applied to sperm, however coral oocytes have not been successfully cryopreserved yet. One of the main reasons is eggs sensitivity to chilling (Hagedorn and Spindler, 2014) which results on affectations on the cell membrane properties, function and integrity (Lin and Tsai, 2012). We obtained similar results when tested cryopreservation of *O. faveolata* oocytes, after the freeze-thaw processes all oocytes disintegrated.

This work supports Hagedorn *et al.* (2006; 2012) calls for the development of cryopreservation protocols that can be used to create a cryobiology bank to secure existing coral species and their genetic diversity. Today, there are three long-term cryobanks in the world where coral cells are stored, two of them located in the U.S. at the Smithsonian Institution at the Hawaii Institute of Marine Biology and the U.S. department of Agriculture's Animal Germplasm Program, and one in Australia at the Taronga Western Plains Zoo (Hagedorn and Spindler, 2014). Cryopreservation of coral gametes could play an important role in near-future coral restoration and may also contribute to expand coral nurseries projects by including sexually reproductive corals (Hagedorn and Spindler, 2014), that like *O. faveolata*, reproduces sexually only once a year.

More studies on coral cryopreservation techniques, fertilization success and development of larvae and recruits after cryopreservation are in need. The use of sperm cryopreservation techniques, such as the one tested in this study, can potentially help to preserve gene diversity, prevent coral extinctions, and create opportunities for diversifying shrinking populations by avoiding natural loss in heterozygosity due to genetic drift (Hagedorn and Spindler, 2014). In addition, it can allow us to advance in research on coral developmental biology, genetics, systematics and molecular biology.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks for the institutions that were part of the project and support us all the way: Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL), Calipso Dive Center and Tayrona National Natural Park Authority; and to all that were part of the project. Special thanks to M.A. Martínez-Silva for the advice and assistance in the laboratory, Vanessa Carrillo from the Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL) and Cesar García (TNNP) for their invaluable collaboration,

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece especialmente a las instituciones que formaron parte del proyecto y nos han apoyado a lo largo de este estudio: la Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL), Calipso Dive Center y al Parque Nacional Natural Tayrona, y a todos los que fueron parte del proyecto. Un agradecimiento especial a MA Martínez-Silva por su asesoramiento y asistencia en el laboratorio, Vanessa Carrillo de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (UJTL) y César García (TNNP) por su inestimable colaboración, y a todos los voluntarios que nos ayudaron en los trabajos de campo. El apoyo financiero fue provisto por UJTL, TNNP y la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología, Banco de la República (Donación # 3193). Finalmente, queremos agradecer a los dos revisores del manuscrito sus comentarios, los cuales han ayudado a mejorar la calidad del artículo.

and to all the volunteers that helped us in the field. Financial support was provided by UJTL, TNNP and the Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología, Banco de la República (Grant # 3193). Finally, we want to thank the two reviewers of the manuscript, their comments improved the quality of the manuscript.

## BIBLIOGRAFÍA / LITERATURE CITED

- Abrámoff, M.D., P.J. Magalhaes and S.J. Ram. 2004. Image processing with ImageJ. Imaging software. 7.
- Albright, A. 2011. Effects of ocean acidification on early life history stages of Caribbean scleractinian corals. Ph.D. Thesis, University of Miami/Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science, Miami. 137 p.
- Benzie, J. and P. Dixon. 1994. The effects of sperm concentration, sperm:egg ratio, and gamete age on fertilization success in crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) in the laboratory. *Biol. Bull.*, 186: 139-152.
- Briones, C., R. Guíñez, O. Garrido, P.A. Oyarzún, J.E. Toro and M. Pérez. 2012. Sperm polymorphism and genetic divergence in the mussel *Perumytilus purpuratus*. *Mar. Biol.*, 159: 1865-1870.
- Carr, M.H. 2000. Marine Protected Areas: challenges and opportunities for understanding and conserving coastal marine ecosystems. *Environ. Conserv.*, 27: 106-109.
- Connell, J.H. 1978. Diversity in tropical rain forest and coral reefs. *Science*, 199: 1302-1310.
- Edwards, A. 2010. Reef rehabilitation manual. Coral Reef Targeted Research and Capacity Building for Management. Santa Lucía, Australia. 166 p.
- Fitzpatrick, J.L., F. García-Gonzalez and J.P. Evans. 2010. Linking sperm length and velocity: The importance of intramale variation. *Biol. Lett.*, 6: 797-799.
- Fukami, H., A.F. Budd, D.R. Levitan, J. Jara, R. Kersanach and N. Knowlton. 2004. Geographic differences in species boundaries among members of the *Montastraea annularis* complex based on molecular and morphological markers. *Evolution*, 58: 324-337.
- Gaitán-Espitia, J.D., M.A. Martínez-Silva, C.E. Borrero, L. Ramírez and J.P. Valencia. 2013. Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (*Lutjanus synagris*): Testing the effects of extenders and freezing rates on sperm quality. *Aquaculture*, 384-387: 6-12.
- Gakhova, E.N., I.V. Krasts, T. Naidenko, N.A. Savel and B.I. Bessonov. 1988. Embryonic development of sea urchin after low temperature preservation. *Ontogenez*, 19: 175-180.
- Goldberg, J. and C. Wilkinson. 2004. Global threats to coral reefs: coral bleaching, global climate change, disease, predator plagues, and invasive species. 67-92. In: Wilkinson, C. (Ed.) Status of coral reefs of the world: 2004. Global Coral Reef Monitoring Network, Sidney, Australia. 572 p.
- González, E. y J. Díaz. 2001. Principios básicos de la criopreservación de esperma en peces. 253-264. In: Rodríguez, H., P. Victoria and M. Carrillo (Eds.). Fundamentos de acuicultura continental. INPA-Serie Fundamentos No 1, Bogotá. 286 p.
- Graham, N.A.J., S. Wilson, S. Jennings, N.V.C. Polunin and J.P. Bijoux. 2006. Dynamic fragility of oceanic coral reef ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103: 8425-8429.
- Hagedorn, M. and R. Spindler. 2014. The reality, use and potential for cryopreservation of coral reefs. 317-329. In: Holt, W., J.L. Brown and P. Comizzoli (Eds.). Reproductive sciences in animal Conservation. Adv. Exp. Med. Biol., Springer, New York. 753 p.
- Hagedorn, M., V.L. Carter, R.A. Steyn, D. Krupp, J.C. Leong, R.P. Lang and T.R. Tiersch. 2006. Preliminary studies of sperm cryopreservation in the mushroom coral, *Fungia scutaria*. *Cryobiology*, 52: 454-458.

- Hagedorn, M., V.L. Carter, J.C. Leong and F.W. Kleinans. 2010. Physiology and cryosensitivity of coral endosymbiotic algae (*Symbiodinium*). *Cryobiology*, 60: 147-158.
- Hagedorn, M., M.J.H. Van Oppen, V. Carter, M. Henley, D. Abrego, E. Puill-Stephan, A. Negri, A. Heyward, D. MacFarlane and R. Spindler. 2012. First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created. *Cryobiology*, 65: 157-158.
- Harrison, P.L. 2011. Sexual reproduction of scleractinian corals. 59-85. In: Dubinsky, Z. and N. Stambler (Eds.). *Coral reefs: An ecosystem in transition*. Springer, Netherlands. 552 p.
- Harrison, P.L. and C.C. Wallace. 1990. Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. 133-207. In: Dubinsky, Z (Ed.). *Coral Reefs. Ecosystems of the World*. Elsevier, Amsterdam. 550 p.
- Hoegh-Guldberg, O. 1999. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Fresh. Res.*, 50: 839-866.
- Johnson, S.L. and P.O., Yun. 2004. Remarkable longevity of dilute sperm in a free-spawning colonial ascidian. *Biol. Bull.*, 39: 144-151.
- Landry, C., L.B. Geyer, Y. Arakaki, T. Uehara and S.R. Palumbi. 2003. Recent speciation in the Indo-West Pacific: Rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. *Proc. Biol. Sci.*, 270: 1839-1847.
- Levitán, D.R. 1991. Influence of body size and population density on fertilization success and reproductive output in a free-spawning invertebrate. *Biol. Bull.*, 181: 261-268.
- Levitán, D.R. and C. Petersen. 1993. Sperm limitation in the sea. *TREE reviews*, 10(6): 228-231.
- Levitán, D.R., M.A. Sewell and F.S. Chia. 1992. How distribution and abundance influences fertilization success in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Ecology*, 73: 248-254.
- Levitán, D.R., N.D. Fogarty, J. Jara, K.E. Lotterhos and N. Knowlton. 2011. Genetic, spatial, and temporal components of precise spawning synchrony in reef building corals of the *Montastraea annularis* species complex. *Evolution*, 65: 1254-1270.
- Lin, C. and S. Tsai. 2012. The effect of chilling and cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes during short-term low temperature preservation. *Theriogenology*, 77: 1257-1261.
- Moreno-Gil, J.S. 1998. *Procedimientos estadísticos con Statgraphics*. Esic editorial, Madrid, España. 528 p.
- Morisawa, M. 1994. Cell signaling mechanism for sperm motility. *Zool. Sci.*, 11: 647-662.
- Morita, M., A. Nishikawa, A. Nakajima, A. Iguchi, K. Sakai, A. Takemura and M. Okuno. 2006. Eggs regulate sperm flagellar motility initiation, chemotaxis and inhibition in the coral *Acropora digitifera*, *A. gemmifera* and *A. tenuis*. *J. Exp. Biol.*, 209: 4574-4579.
- Odintsova, N.A. and A.V. Boroda. 2012. Cryopreservation of the cells and larvae of marine organisms. *Russ. J. Mar. Biol.*, 38(2): 101-111.
- Oliver, J. and R. Babcock. 1992. Aspects of the fertilization ecology of broadcast spawning corals: Sperm dilution effects and *in situ* measurements of fertilization. *Biol Bull.*, 183: 409-417.
- Paniagua-Chávez, C.G. and T.R. Tiersch. 2001. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology*, 43: 211-223.
- Pegg, D. E. 2007. Principles of cryopreservation. *Meth. Mol. Biol.*, 368: 39-57.
- Rearser, J.K., R. Pomerance and P.O. Thomas. 2000. Coral bleaching and global climate change: Scientific findings and policy recommendations. *Cons. Biol.*, 14: 1500-1511.
- Rinkevich, B. 2005. Conservation of coral reefs through active restoration measures: recent approaches and last decade progress. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 4333-4342.
- Rose, C.D. and E. Heath. 1978. Viability of American oyster, *Crassostrea virginica*, spermatozoa exposed to stress. *Estuaries*, 1: 245-251.
- Rurangwa, E., D. Kime, F. Ollevier and J. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 243: 1-28.
- Vermeij, M.J.A., E. Sampayo, K. Bröker and R.P.M. Bak. 2003. Variation in planulae release of closely related coral species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 247: 75-84.
- White, A.T. and C.A. Courtney. 2004. Policy instruments for coral reef management and their effectiveness: 128-148. In: Ahmed, M., C.K. Chong and H. Cesar (Eds.). *Economic valuation and policy priorities for sustainable management of coral reefs*. WorldFish Center Conf. Proc. 70: 222 p.
- Wildt, D.E., P. Comizzoli, B. Pukazhenthil and N. Songsasen. 2010. Lessons from biodiversity-The value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Mol. Reprod. Dev.*, 77: 397-409.
- Wilkinson, C.R. 1999. Global and local threats to coral reef functioning and existence: Review and predictions. *Mar. Fresh. Res.*, 50: 867-878.
- Wolf, K.N., D.E. Wildt, A. Vargasm P.E. Marinari, M.A. Ottinger and J.G. Howard. 2001. Reproductive inefficiency in male black-footed ferrets (*Mustela nigripes*). *Zoo. Biol.*, 19: 517-528.
- Yoshida, M., K. Inaba, K. Ishida and M. Morisawa. 2002. A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 14831-14836.
- Yund, P.O. 2000. How severe is sperm limitation in natural populations of marine free-spawners? *Trends. Ecol. Evol.*, 15: 10-13.