

OAC-NDHU-109-10（研究報告）

珊瑚醫院之冷凍方舟研究
（全案成果報告）

學校：國立東華大學

指導教授：林家興

學生：杜恩純

研究期程：中華民國109年05月至109年12月

研究經費：新臺幣8萬元

海洋委員會補助研究

中華民國 109年 10月

「本研究報告僅供海洋委員會施政參考，並不代表該會政策，

該會保留採用與否之權利。」

目 次

表次.....	(3)
摘要.....	(4)
第一節 前言.....	(5)
第二節 研究方法與過程.....	(8)
第三節 初步研究發現與成果.....	(10)
第四節 討論.....	(12)
第五節 結論.....	(14)
參考資料.....	(15)

表 次

表1 珊瑚冷凍保存列表.....	(10)
------------------	------

摘要

全球珊瑚正遭受嚴重威脅，因此通過建立“珊瑚醫院”來應對當前的珊瑚礁危機。冷凍保存在本研究室已有成果並有重要的國際研究論文發表。本實驗的目的是冷凍保存各種珊瑚細胞配合最佳抗凍劑及平衡時間，成功的把珊瑚細胞冷凍保存並建立珊瑚基因庫。本實驗以 *Acropora*, *Pocillopora*, *Acanthastrea*, *Porites*, *Montipora*, *Platygyra*, *Symphylia* 和 *Hydnophora* 屬配合3種不同類型的抗凍劑（MeOH，EG，DMSO）進行實驗。結果顯示 *A. muricata*, *A. nana*, *P. damicornis*, *P. lutea*, *P. lobata* 和 *H. exesa* 在冷凍保存中存活率最佳。然而，存活率最差的珊瑚為 *A. azurea*, *A. subulata*, *P. meandrina*, *P. eydouxi*, *A. hemprichii*, *A. echinata*, *P. murrayensis* 和 *H. rigida*。本結果可用於參考從 *Acropora* 屬的珊瑚適合使用2M MeOH作為抗凍劑，*Pocillopora* 屬和 *Porites* 屬的珊瑚則建議使用2M DMSO作為抗凍劑，*Acanthastrea* 屬和 *Hydnophora* 屬的珊瑚則建議使用1M DMSO作為抗凍劑。五種珊瑚屬的平衡時間以20分鐘為最佳。珊瑚醫院之冷凍方舟旨在於日後可為珊瑚復育、保育及永續海洋所盡的一份心力。

關鍵字：珊瑚細胞，冷凍保存，珊瑚基因庫

第一節 前言

1.1 緣起

在珊瑚醫院的計劃中，我們將建立國際上第一個超過百種珊瑚冷凍基因庫 ”珊瑚冷凍方舟”。目前冷凍保存珊瑚活細胞、DNA、蛋白質、配子、幼生及共生藻方面在本研究室已有成果並有重要的國際研究論文發表。本計劃預計於本年度進行珊瑚樣品蒐集及調查範圍包含墾丁沿岸之約20種石珊瑚、柳珊瑚及軟珊瑚。珊瑚樣品自採獲並診斷為健康的珊瑚後，將進行低溫冷凍保存於珊瑚冷凍方舟(冷凍基因庫)中。珊瑚冷凍方舟將依照OECD的指導方針，提供安全及長期穩定性珊瑚冷凍保存資料庫。也將為未來有關珊瑚基因、蛋白質體、繁養殖研究，提供穩定的資源和資訊。本計劃也將與國際性研究計劃 The Frozen Ark配合，部份珊瑚樣品也將會運送至其它國際基因冷凍保存研究中心，進行全球珊瑚基因資料庫之建立。另外本計劃將透過學術網路與The Frozen Ark之國際基因冷凍保存研究中心合作，相互提供及分享最新的資料。此項工作不僅對各國生物多樣性之研究、教育、保育與資源永續利用十分重要，同時也是加速全球物種調查、研究、發現與描述之重要工具與媒介。

1.2 研究背景與動機

全球珊瑚正遭受嚴重威脅，(1)全球氣候暖化所造成的海水溫度上升:工業革命以來，人類開始大量的製造二氧化碳、甲烷等溫室氣體，產生了溫室效應，使得全球暖化。(2)近海的汙染與開發:近海所排放的汙水中除了有毒物質外，還含有許多的高營養鹽的物質，而營養鹽的增加，使得藻類增生並與珊瑚競爭陽光與空間，造成珊瑚的破壞與白化，而土地的開發更破壞珊瑚礁的棲地及生態。(3)過漁及使用底拖網:珊瑚礁中通常含有許多具有經濟價值的生物，有些漁民使用底拖網進行漁撈，嚴重破壞珊瑚礁生態。(4)人類從事海水活動:除了近海進行的水上遊憩所造成的汙染外，常有認知不足的浮潛及潛水遊客，隨意觸碰、踩踏及採集珊瑚。以上都已經造成珊瑚礁嚴重的破壞，也導致珊瑚生態系統受到嚴重的影響，因此當務之急是能找出有效拯救珊

珊瑚的方式。

有鑑於此，我們構想出以人類醫院之處理機制為基準及想法來建立“珊瑚醫院”，並於國際期刊中發表此提案式的報告(Mayfield et al., 2019)。此珊瑚醫院的構想對於珊瑚復育具有重大的意義，珊瑚復育區的設置對於健全海洋生態系、維持珊瑚礁物種棲地、生物多樣性及海洋生產力皆有重要的影響。不健康的珊瑚將透過珊瑚醫院的診斷來辨別其病原（例如疾病、高溫、污染物壓力），確診後即進行治療，不健康的珊瑚將會被移至珊瑚復育區使其恢復至健康狀態，康復後的珊瑚將會被送回海洋原棲地，又或者被移植到健康的海洋環境。為了更加瞭解珊瑚在海洋中的恢復能力，造成珊瑚生病的病因診斷數據將會被用於海洋環境的修復計劃。若生病珊瑚在珊瑚醫院治療期間，生長有顯著的改善，其將被移植到其他地點並且持續進行監控，若康復後的珊瑚回到海洋環境依然無法適應環境回復健康，我們將利用超低溫冷凍保存技術將珊瑚配子及其遺傳物質冷凍保存並建立珊瑚冷凍方舟，藉以保存珍貴珊瑚物種及維護珊瑚遺傳多樣性與未來海洋的永續利用。另外，當珊瑚被診斷為健康的狀態，適量的珊瑚送入珊瑚冷凍方舟(冷凍基因庫)進行冷凍保存，冷凍解凍的珊瑚還是需要於加護池區中進行觀察，隨後送到一般池區或珊瑚基因庫進行養殖或轉植回海洋中進行後續的追蹤。

1.3 研究目的

於 2006 年至 2019 年由本低溫生物研究室及美國史密森海洋研究中心於國際上首次進行珊瑚配子冷凍保存研究並發表於國際期刊後（Tsai et al., 2010），相繼有日本、法國、澳洲、紐西蘭、義大利等各國才陸續的有相關的珊瑚冷凍保存研究報告產出。本計劃將尋找冷凍保存與各種珊瑚細胞配合之最佳抗凍劑和平衡時間，並成功的把珊瑚細胞冷凍保存入珊瑚基因庫。重點是在未來促使台灣加入國際組織”The Frozen Ark”並預期建立國際冷凍基因庫(活細胞、DNA、蛋白質、配子、幼生及共生藻)“珊瑚冷凍方舟”以顯著提升台灣能見度。The Frozen Ark 進行各類

瀕危物種的標本採集冷凍，以應對目前全球許多物種正瀕臨絕種的危機。珊瑚樣品自採獲後，將低溫冷凍保存於珊瑚冷凍方舟(冷凍基因庫)中。珊瑚冷凍方舟將依照 OECD 的指導方針，提供安全及長期穩定性珊瑚冷凍保存資料庫。也將為未來有關珊瑚基因、蛋白質體、繁養殖研究，提供穩定的資源和資訊。部份珊瑚樣品將會運送至 The Frozen Ark 國際基因冷凍保存研究中心，進行全球珊瑚基因資料庫之建立。

1.4 預期目標與進度說明

全球尚未有超過50種冷凍保存珊瑚生殖細胞及遺傳物質的基因庫，珊瑚醫院之冷凍方舟旨在於日後可為珊瑚復育、保育及永續海洋所盡的一份心力。冷凍保存技術將會是保護擁有豐富生態系統的珊瑚礁及生物多樣性的最後努力，珊瑚生殖細胞及遺傳物質之冷凍保存將會是珊瑚保育工作的重要工作項目。要達成此目標，必須將珊瑚遭遇低溫過程中所出現的細胞凋亡現象減至最低，此計劃以達到成功冷凍保存各種珊瑚細胞及遺傳物質為最終目的。預計實驗的二十種珊瑚萃取，目前已經完成了20種珊瑚的實驗，其中的14種珊瑚已成功的冷凍保存在珊瑚基因庫裡面。

第二節 研究方法與過程

本研究所使用的樣品實驗分成爲四個階段，1. 珊瑚細胞及共生藻(*Symbiodinium*)萃取；2. 低溫冷凍對於珊瑚細胞和共生藻之影響；3. 冷凍後珊瑚細胞和共生藻之總蛋白測試；4.珊瑚基因庫實驗。

2.1 珊瑚採集

本研究所使用的珊瑚碎片大小約 3x3 cm² 採集於臺灣墾丁國家公園內後壁湖地區(珊瑚種類如下表)，採集人員以水肺潛水方式進行採集後立即將樣品放置於 25°C (5 噸循環海水缸、自然光以及約 35ppt 海水)循環海水缸。

2.2 珊瑚細胞及共生藻萃取

珊瑚碎片浸泡於含有 1.25g NAC 和 0.25g TRYPSIN 的 50 mL 萃取液中，pH 值爲 8.2 至 8.4。萃取所需要的時間（70-80%的珊瑚細胞脫落）取決於珊瑚的類型、大小和狀況。萃取細胞後（宿主細胞和共生藻），使用 2000rpm 轉速離心 3 分鐘，取 1.5ml 的下清液並且加入 60ml 過濾海水進行清洗，再次進行二次離心，吸取冷凍實驗所需的量。

2.3 珊瑚鑑種

珊瑚碎片浸泡在 60%的次氯酸鈉 1-2 天，漂白後使用蒸餾水進行清洗，然後置放在室溫下風乾。使用解剖顯微鏡進行珊瑚蟲以及骨片的分析，該相關的特徵（如珊瑚岩結構）將成爲關鍵。小部分的樣品將被送到其他實驗室進行雙向鑒定。

2.4 珊瑚冷凍及解凍

本次實驗使用三種抗凍劑分別為甲醇(MeOH)、乙二醇(EG)和二甲基亞砷(DMSO)，且搭配兩種濃度進行冷凍保存。不同抗凍劑與珊瑚萃取物混合，搭配不同

平衡時間 (10 分鐘和 20 分鐘)，平衡期間將樣品吸入至 0.5ml 麥管。將麥管置放在兩段式冷凍裝置冷凍 (Lin et al., 2019; Viyakarn et al., 2018) 後浸泡在液態氮至少 30 分鐘，將麥管取出並放置於 37°C 水浴槽中，進行解凍 10 秒。將樣品取出並以過濾海水進行清洗，離心 3 分鐘後，以 500µl 下清液進行 ATP、細胞密度和總蛋白測試。

2.5 活性測試和細胞密度計算

Adenosine triphosphate (ATP) 之檢測

本次研究使用了 Cellular ATP Kit HTS 進行 ATP 之檢測。ATP 酵素將和分解液混合均勻，並且存放在 -80°C 冰箱保存起來。將 50µl 樣品置放於冷光分析試管中，加入 50µl ATP 酵素，混合均勻並放在室溫下反應 3 分鐘，之後利用冷光分析儀進行 ATP 之檢測 (Cirino et al., 2019)。

將 10µl 樣品打入血球計數器，並計算其細胞和共生藻密度。通過以下方程式計算血球計數器總面積的平均：

$$\frac{n}{4} = \text{總量} \times 10^4$$

$$n = \text{細胞總量}$$

第三節 初步研究發現與成果

表 1. 珊瑚冷凍保存列表。

Genus	Species	Shape	First suitable cryoprotectant (%)	Equilibration time (min)	Second suitable cryoprotectant (%)	Equilibration time (min)	Cryopreserved straws quantity (0.5ml)
<i>Acropora</i>	<i>nana</i>	Branching	2M MeOH (24)	10	1M MeOH (17)	20	15
<i>Acropora</i>	<i>azurea</i>	Branching	1M EG (8)	10	1M MeOH (7)	20	15
<i>Acropora</i>	<i>subulata</i>	Branching	1M EG (7)	20	1M MeOH (7)	20	15
<i>Acropora</i>	<i>muricata</i>	Branching	1M MeOH (29)	10	2M MeOH (25)	10	15
<i>Pocillopora</i>	<i>damicornis</i>	Branching	1M DMSO (21)	10	2M DMSO (17)	20	16
<i>Pocillopora</i>	<i>meandrina</i>	Branching	1M DMSO (6)	10	2M DMSO (3)	20	16
<i>Pocillopora</i>	<i>eydouxi</i>	Branching	1M DMSO (3)	20	2M DMSO (2)	20	16
<i>Acanthastrea</i>	<i>hemprichii</i>	Branching	1M DMSO (8)	10	2M DMSO (7)	10	16
<i>Acanthastrea</i>	<i>echinata</i>	Encrusting	1M EG (7)	20	1M DMSO (3)	20	16
<i>Porites</i>	<i>lutea</i>	Massive	1M MeOH (25)	20	2M MeOH (25)	10	16
<i>Porites</i>	<i>lobata</i>	Massive	2M DMSO (31)	10	1M EG (16)	20	16
<i>Porites</i>	<i>murrayensis</i>	Massive	1M DMSO (9)	20	2M DMSO (8)	10	16
<i>Hydnophora</i>	<i>rigida</i>	Encrusting	1M DMSO (9)	20	1M EG (6)	20	15
<i>Hydnophora</i>	<i>exesa</i>	Encrusting	1M DMSO (48)	20	2M DMSO (41)	10	15

本實驗以 *Acropora*, *Pocillopora*, *Acanthastrea*, *Porites*, *Montipora*, *Platygyra*, *Symphylia* 和 *Hydnophora* 屬配合 3 種不同類型的抗凍劑 (MeOH, EG, DMSO) 進行實驗。*A. muricata*, *A. nana*, *P. damicornis*, *P. lutea*, *P. lobata* 和 *H. exesa* 在冷凍保存中表現最佳。然而，存活率最差的珊瑚是 *A. azurea*, *A. subulata*, *P. meandrina*, *P. eydouxi*, *A. hemprichii*, *A. echinata*, *P. murrayensis* 和 *H. rigida*。表 1 可以很明顯的看出就算是同屬的珊瑚存在對於不同類型抗凍劑的適應，並且在抗凍劑的適應程度也有極大的差別。除此以外，平衡時間在於最適合和其次適合的抗凍劑也有明顯差別，可是這對冷凍保存中的表現沒有太大的影響除了 *P. lobata* 珊瑚以外。

P. damicornis, *P. meandrina* 和 *P. eydouxi* 適用於 1M DMSO 和 2M DMSO 進行冷凍保存。另外，*A. muricata* 和 *A. nana* 對 1M MeOH 和 2M MeOH 作為抗凍劑有最佳的存活率。另外 *A. azurea* 和 *A. subulata* 以 1M EG 作為抗凍劑具有較佳的存活率。但總體而言，*A. muricata*, *A. nana*, *A. azurea* 和 *A. subulata* 對 1M 和 2M MeOH 也顯示良性跡象。另外，*A. hemprichii* 和 *A. echinata* 抗凍劑有最佳的存活率在 1M DMSO 和 2M DMSO 與 *P. lutea*, *P. lobata*, *P. murrayensis*, *H. rigida* 和 *H. exesa* 的最佳抗凍劑相同，但是 *P. lutea*, *P. lobata*, 和 *P. murrayensis* 也適用於 MeOH 和 EG，對於所有的抗凍劑都適合。

本實驗中綜合有 20 種珊瑚萃取，其中有 *A. humilis*, *A. gemnifera*, *M. altasepta*, *M. foliosa*, *M. verrucose*, *P. lamelina*, *S. agaricia* 和 *P. speciosa* 因 ATP 活性低，導致數值不佳。失敗的因素將在討論區深入的瞭解。

第四節 討論

MeOH, DMSO, 和 EG 都是具有膜滲透性的抗凍劑 (Drake et al., 2018)。抗凍劑是否適用於珊瑚的可能性取決於原生微生物群 (Lee et al., 2016), 也取決於其本身對於細胞的毒性 (Lee et al., 2016) 和胞器內的脫水壓力 (Drake et al., 2018)。抗凍劑可能會對細胞造成永久性損害 (Tsai et al., 2014), 這解釋了為什麼某些抗凍劑不起作用的原因, 尤其是對於 *A. subulata*, *P. meandrina* 和 *P. eydouxi*。根據 Feuillassier et al. (2014), 來自 *P. damicornis* 組織球的耐受性被用作抗凍劑暴露的指標。與我們的珊瑚冷凍保存實驗相比, 具有分生組織細胞的 *P. damicornis* 對乾燥的環境具有較高的耐受性, 並且在冷凍保存後暴露於液態氮中仍具有很高的存活率 (Feuillassier et al., 2014), 此比對再次證明了同屬珊瑚也會具有不一樣的性質, 才會出現同屬之間的珊瑚有不穩定的冷凍保存結果。

野外珊瑚的冷凍保存實驗並非總是一帆風順, 特別是在萃取珊瑚細胞方面。主要的障礙來自珊瑚本身, 野外珊瑚在收集後因受到外界壓力而產生黏液以用於防禦目的, 並且黏液有時會在珊瑚表面持續數天, 使實驗無法進行。因此, 在實驗中存在的黏液嚴重影響了測定的活性檢測以及細胞和共生菌科聚集在一起的細胞計數的準確性。此外, 珊瑚黏液會聚集多環芳烴 (Han et al., 2020), 對於珊瑚也有一定的影響。黏液捕獲有機物 (Wild et al., 2004a), 也會變成微生物消費者食物的載體。黏液的分泌不僅導致珊瑚本身損失了 49% 的固定能量 (Davies, 1984), 而且消耗了更多的氧氣, 產生了更多的溶解性無機碳, 導致需氧降解, 並導致細菌數量增加了 100 倍 (Wild et al., 2004b)。Ferrier-Pages et al. (2000) 和 Moriarty et al. (1985) 表明, 即使少量的珊瑚滲出物也可以刺激珊瑚周圍的微生物生長, 從而在低溫保存過程中造成氧化損傷, 從而導致缺乏生存力 (Glynn., 1990)。珊瑚黏液對自身帶來的弊大於利 (Lee et al., 2016) 而且珊瑚所分泌的黏液會為宿主細胞的提取帶來困難且降低其品質, 導致收集的細胞數大量減少, 無法與既定的抗凍劑配合使用。珊瑚採集回來一至兩天後, 才是

進行實驗的最佳時機。除此之外，黏液還會引起相關微生物群落的增加，進而損害珊瑚本身（Lee et al., 2016）。

另一個障礙來自環境的壓力，主要是溫度相關的壓力影響野生珊瑚。一旦珊瑚經歷了白化，就需要較長的時間才能使珊瑚再生，這間接地影響了我們早期的研究實驗在萃取珊瑚細胞方面，更不用說使受損的珊瑚宿主細胞進行冷凍保存，而對於健康的珊瑚宿主細胞而言，一次白化會造成約 60% 的珊瑚細胞死亡，而反覆的白化則會導致高達 75% 的細胞死亡（Ainsworth et al., 2016）。Howells et al. (2011) 和 Bellantuono et al. (2011) 證明了長期處於溫暖礁石上的 *A. millepora* 受到白化和組織死亡，高達 80 % 的共生藻從宿主組織中消失了而 *M. Franksi*, *M. Cavernosa* 和 *F. fragum* 白化損失了 50% 至 80% 的藻細胞（Venn et al., 2006），導致珊瑚沒辦法光合作用，細胞也恢復較慢，但是 Venn et al. (2006) 也表明，長時間暴露在高溫下的 *P. astreoides* 和 *P. porites* 的色素雖然減少，宿主組織中的共生植物並沒有減少，這對珊瑚的未來是件好事，也代表著珊瑚未來對於世界溫度升溫的應變。

最後，表 1 顯示了趨勢。*Acropora* 屬的珊瑚適合使用 2M MeOH 作為抗凍劑，*Pocillopora* 屬的珊瑚則建議使用 2M DMSO 作為抗凍劑，*Acanthastrea* 屬和 *Hydnophora* 屬的珊瑚則建議使用 1M DMSO 作為抗凍劑，以及 *Porites* 屬的珊瑚則建議使用 2M DMSO 作為抗凍劑。五種珊瑚屬的平衡時間以 20 分鐘為最佳。

第五節 結論

這項研究顯示了珊瑚經過抗凍劑最佳適應性測試，並也建立珊瑚基因庫，供世界珊瑚冷凍保存研究參考，但得考慮在不同位置的相同珊瑚種類對抗凍劑的適應性可能存在差異。資源較少的國家能夠利用這項研究來保護珊瑚，提高對珊瑚白化的認識以及全球珊瑚面臨的危害，並促進珊瑚基因庫成為保護未來的主流珊瑚，將拯救對人類和其他生物至關重要的珊瑚礁群落。總而言之，每種珊瑚都是獨特的，這也提醒必須探討及解決一些無可避免的問題，諸如珊瑚黏液的存在對與螢光素酶反應的理解以及對珊瑚細胞組織有更深層的理解。

第六節 參考文獻

1. Bellantuono, A. J., Hoegh-Guldberg, O., & Rodriguez-Lanetty, M. (2012). Resistance to thermal stress in corals without changes in symbiont composition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1731), 1100-1107.
2. Cirino, L., Wen, Z. H., Hsieh, K., Huang, C. L., Leong, Q. L., Wang, L. H., Chen, C. S., Daly, J., Tsai, S. & Lin, C. (2019). First instance of settlement by cryopreserved coral larvae in symbiotic association with dinoflagellates. *Scientific Reports*, 9(1), 1-8.
3. Davies, P.S. (1984). The role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora eydouxi*. *Coral Reefs*, 2, 181-186.
4. Drake, J.L., Schaller, M., Mass, T., Godfrey, L., Fu, A., Sherrell, R., Rosenthal, Y., & Falkowski, P. (2018). Molecular and geochemical perspectives on the influence of CO₂ on calcification in coral cell cultures. *Limnology and Oceanography*, 63, 107-121.
5. Ferrier-Pages, C., Leclercq, N., Jaubert, J., Pelegri, S.P. (2000). Enhancement of pico- and nanoplankton growth by coral exudates. *Aquatic Microbial Ecology* 21:203–209.
6. Feuillassier, L., Martinez, L., Romans, P., Engelmann-Sylvestre, I., Masanet, P., Barthélémy, D., & Engelmann, F. (2014). Survival of tissue balls from the coral *Pocillopora damicornis* L. exposed to cryoprotectant solutions. *Cryobiology*, 69(3), 376-385.
7. Glynn, P. W. (1990). Coral mortality and disturbances to coral reefs in the tropical eastern Pacific. Elsevier. In *Elsevier oceanography series* (Vol. 52, pp. 55-126).
8. Han, M., Zhang, R., Yu, K., Li, A., Wang, Y., & Huang, X. (2020). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in corals of the South China Sea: Occurrence, distribution, bioaccumulation, and considerable role of coral mucus. *Journal of hazardous materials*, 384, 121-299.

9. Howells, E. J., Beltran, V. H., Larsen, N. W., Bay, L. K., Willis, B. L., & Van Oppen, M. J. H. (2012). Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nature Climate Change*, 2(2), 116-120.
10. Lee, S., Davy, S. K., Tang, S. L., & Kench, P. S. (2016). Mucus sugar content shapes the bacterial community structure in thermally stressed *Acropora muricata*. *Frontiers in microbiology*, 7, 371.
11. Lin, C., Thongpoo, P., Juri, C., Wang, L. H., Meng, P. J., Kuo, F. W., & Tsai, S. (2019). Cryopreservation of a thermotolerant lineage of the coral reef dinoflagellate *Symbiodinium*. *Biopreservation and Biobanking*, 17(6), 520-529.
12. Mayfield, A. B., Tsai, S., & Lin, C. (2019). The coral hospital. *Biopreservation and biobanking*, 17(4), 355-369.
13. Moriarty, D. J. W., Pollard, P. C., Alongi, D. M., Wilkinson, C. R., & Gray, J. S. (1985). Bacterial productivity and trophic relationships with consumers on a coral reef (MECOR 1). *Proc 5th Int Coral Reef Cong, Tahiti, Vol 3*, p 457–462.
14. Tsai, S., Spikings, E., Kuo, F. W., Lin, N. C., & Lin, C. (2010). Use of an adenosine triphosphate assay, and simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide, to evaluate the effects of cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes. *Theriogenology*, 73(5), 605-611.
15. Tsai, S., Jhuang, Y., Spikings, E., Sung, P. J., & Lin, C. (2014). Ultrastructural observations of the early and late stages of gorgonian coral (*Junceella juncea*) oocytes. *Tissue and Cell*, 46(4), 225-232.
16. Venn, A. A., Wilson, M. A., Trapido-Rosenthal, H. G., Keely, B. J., & Douglas, A. E. (2006). The impact of coral bleaching on the pigment profile of the symbiotic alga, *Symbiodinium*. *Plant, cell & environment*, 29(12), 2133-2142.
17. Viyakarn, V., Chavanich, S., Chong, G., Tsai, S., & Lin, C. (2018). Cryopreservation of sperm from the coral *Acropora humilis*. *Cryobiology*, 80, 130-138.

18. Wild, C., Huettel, M., Klueter, A., Kremb, S. G., Rasheed, M. Y., & Jørgensen, B. B. (2004a). Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. *Nature*, 428(6978), 66-70.
19. Wild, C., Rasheed, M., Werner, U., Franke, U., Johnstone, R., & Huettel, M. (2004b). Degradation and mineralization of coral mucus in reef environments. *Marine Ecology Progress Series*, 267, 159-171.