

## A sticky thicket of glue cells: A comparative morphometric analysis of colloblasts in 20 species of comb jelly (phylum Ctenophora)

### Una maraña pegajosa de células adhesivas: Análisis comparativo de la morfometría de coloblastos en 20 especies de nuez de mar (filo Ctenophora)

Nicholas D Leonardi<sup>1</sup>, Erik V Thuesen<sup>1\*</sup>, Steven HD Haddock<sup>2</sup>

<sup>1</sup> The Evergreen State College, 2700 Evergreen Pkwy NW, Olympia, Washington, 98505, United States

<sup>2</sup> Monterey Bay Aquarium Research Institute, 7700 Sandholdt Road, Moss Landing, California, 95039, United States

\* Corresponding author. E-mail: thuesene@evergreen.edu

**ABSTRACT.** Ctenophores in the class Tentaculata are distinct from Cnidarians in that they use sticky, not stinging, tentacles to capture and subdue their prey. The structures that make these tentacles sticky are colloblasts, specialized multicellular adhesive structures for predation. Located on the tentacles, tentacle side-branches (tentilla), or oral tentilla, colloblasts are only found in comb jellies (phylum Ctenophora). To perform comparative anatomy of the diversity of ctenophore colloblasts, specimens were collected from the epi- to bathypelagic zones near the coasts of central California and the Hawaiian Islands using blue-water divers and remotely operated vehicles. Tentacle samples were immediately fixed in a 4% formalin solution at sea, and then prepared in the lab via secondary fixation in 2% OsO<sub>4</sub> for scanning electron microscopy (SEM). Diversity of ultrastructural characteristics was observed using SEM, and the morphometrics of the collosphere, external secretion granules, and spiral filament were recorded for 20 species, within 9 families and 9 genera, including 13 undescribed species. Morphometry of colloblasts reveals that the shape of the collosphere (the organizational unit of sticky granules) falls into 3 classifications: spherical, ellipsoidal, or non-uniform. External secretion granule deposition falls into 2 categories: clustered or patterned; the cap cell membrane was either present or absent. This morphological variation is summarized graphically and will be useful to describe the functional diversity and feeding ecology of the interesting and controversial phylum Ctenophora.

*Key words:* colloblast, ctenophore, predation, scanning electron microscopy, Tentaculata.

**RESUMEN.** Los ctenóforos de la clase Tentaculata difieren de los cnidarios en que usan tentáculos pegajosos y no punzantes para capturar y dominar a su presa. Las estructuras que vuelven a los tentáculos pegajosos son los coloblastos, estructuras pluricelulares adhesivas especializadas para la depredación. Localizados en los tentáculos, en las ramificaciones de los tentáculos (tentillas) o en las tentillas orales, los coloblastos solo se encuentran en las nueces del mar (filo Ctenophora). Con el fin de realizar una comparación anatómica de los distintos coloblastos en ctenóforos, se recolectaron especímenes desde la zona epipelágica hasta la batipelágica cerca de la costa central de California y de las islas hawaianas utilizando buceo científico (*blue-water diving*) y vehículos sumergidos operados remotamente. Las muestras de tentáculos fueron inmediatamente fijados en el mar en una solución de formalina al 4%, y luego fueron preparados en el laboratorio vía una solución secundaria de OsO<sub>4</sub> al 2% para microscopía electrónica de barrido (MEB). La diversidad de características ultraestructurales fueron observadas utilizando el MEB, y la morfometría de la coloesfera, los gránulos externos de secreción y los filamentos espiralados de 20 especies fueron registrados, dentro de 9 familias y 9 géneros, incluidas 13 especies no descritas. La morfometría de los coloblastos revela que la forma de la coloesfera (la unidad organizacional de gránulos pegajosos) presenta 3 clasificaciones: esférica, elipsoide o no uniforme. La disposición de los gránulos externos de secreción presenta 2 categorías: en cúmulo o en patrón; la membrana de células externas estaba presente o ausente. Esta variación morfológica está resumida en gráficos y será de utilidad para describir la diversidad funcional de este interesante y controversial filo Ctenophora.

*Palabras clave:* coloblastos, ctenóforos, depredación, microscopio electrónico de barrido, Tentaculata.

## INTRODUCTION

Ctenophora is a diverse phylum of gelata consisting of about 190 described species, with estimates for the number of additional undescribed species being roughly equivalent (Appeltans et al. 2012). Molecular and phylogenomic analyses of ctenophores have indicated that they may be the sister group to all other animals (Dunn et al. 2008, Whelan et al. 2017, but see Simion et al. 2017). Dunn et al. (2015)

## INTRODUCCIÓN

Ctenophora es un filo variado de zooplancton gelatinoso que consiste de casi 190 especies descritas, y se estima un número adicional de especies no descritas casi equivalente (Appeltans et al. 2012). Los análisis moleculares y filogenómicos de los ctenóforos han indicado que podrían llegar a ser un grupo hermano de todos los animales (Dunn et al. 2008, Whelan et al. 2017, pero ver Simion et al. 2017). Dunn

highlighted that nonbilaterian phyla do not only possess simple traits but also complex and unique traits, as do bilaterians, making it important to describe traits across all animal phyla in order to properly compare evolutionary relationships and diversification.

Ctenophores are the only organisms that possess colloblasts, specialized adhesive structures for predation. The diversification of feeding behaviors in ctenophores is in part due to the presence or absence of tentacles containing colloblasts, and the manner in which they are arranged (Komai 1922, Mackie et al. 1988, Emson and Whitfield 1991, Matsumoto and Harbison 1993, Haddock 2007). Through the use of electron microscopy, morphometrics of colloblasts have been recorded for some species (Bargmann et al. 1972; Benwitz 1978; Franc 1978; Mackie et al. 1988; Emson and Whitfield 1991; Carré and Carré 1993a, b; Eeckhaut et al. 1997), but only one study has compared variation in colloblasts across a small portion (4 species from 4 families) of the phylum (Franc 1978). Colloblast polymorphisms within a species have only been observed in *Minictena luteola* (Carré and Carré 1993b). The vocabulary associated with colloblasts has long been confused, but von Byern et al. (2010) have recently clarified a standard terminology, which is used herein (Fig. 1). The goal of the present study is to survey the diversity of colloblast characteristics across the phylum through the use of scanning electron microscopy (SEM) and morphometric analyses.

## MATERIALS AND METHODS

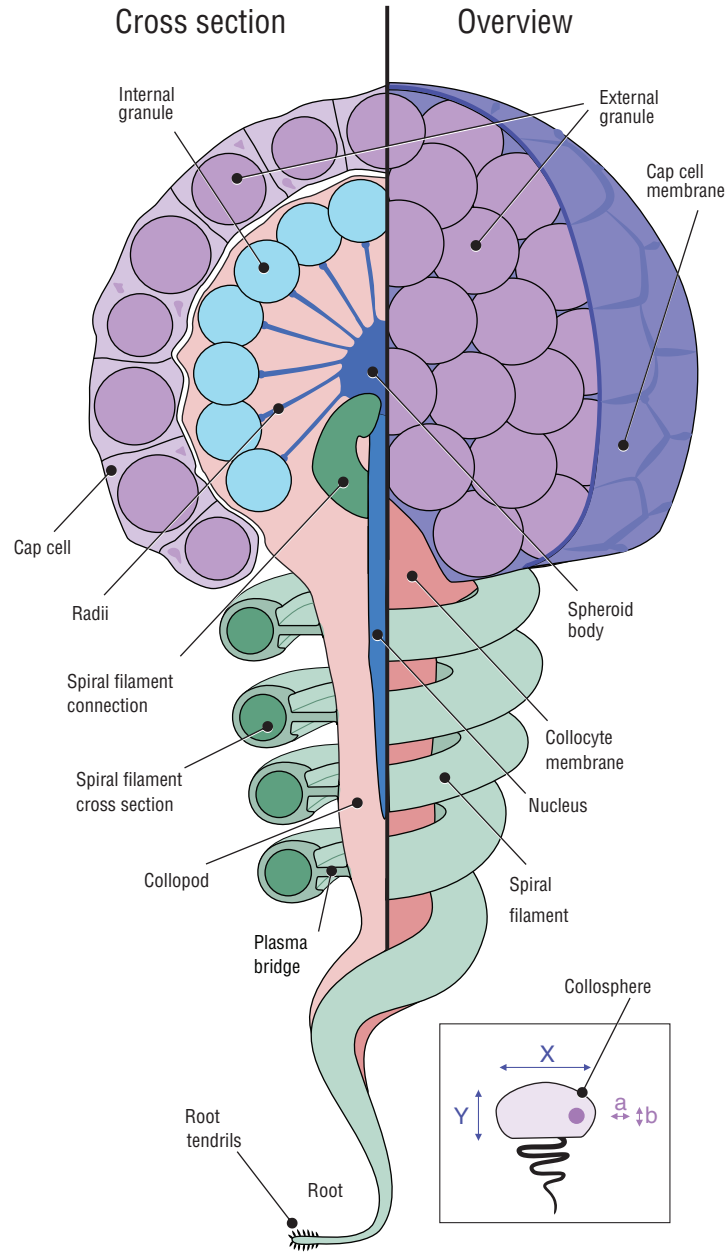
Twenty species of ctenophores were collected from the epi- to bathypelagic zones off the coasts of central California and the Hawaiian Islands. These locations are advantageous because of their relatively near-shore access to very deep environments (Haddock et al. 2017). Shallow species were hand-collected in glass jars by blue-water divers (Haddock and Heine 2005). Meso- and bathypelagic species were collected using suction samplers and detritus samplers on remotely operated vehicles from the Monterey Bay Aquarium Research Institute (Robison 1993). When found extended in the feeding position, tentacles were sucked into a Pasteur pipette and separated from the animal. Tentacles retracted into the tentacular bulb were dissected from intact animals using fine metal forceps and surgical scissors. Tentacles were then prepared by primary fixation at sea using 4% borax-buffered formalin in filtered seawater. In the lab, tentacles were washed with 2.5% NaHCO<sub>3</sub> for 30–45 min, and secondary fixation was carried out using 2% OsO<sub>4</sub> in 1.25% NaHCO<sub>3</sub> for 2–3 h depending on the size of the sample. After secondary fixation, tentacles were rinsed with deionized water until the solution ran clear. Tentacles were dehydrated through an ethanol gradient using Reichert capsules, critical-point dried in acetone-carbon dioxide using a SAMDRI-PVT-3D, and then sputter coated with gold-palladium using a HUMMER 6.2.

et al. (2015) han subrayado que los filos no bilaterales no solamente poseen rasgos simples, sino también rasgos únicos y complejos como los bilaterales, lo cual resalta la importancia de describir los rasgos en todos los filos animales para poder comparar adecuadamente las relaciones evolutivas y la diversificación.

Los ctenóforos son los únicos organismos que poseen colloblastos, estructuras adhesivas especializadas para la depredación. La diversificación en el comportamiento alimentario en los ctenóforos se da, en parte, gracias a la presencia o ausencia de tentáculos que contienen colloblastos y la manera en la cual éstos se encuentran ordenados (Komai 1922, Mackie et al. 1988, Emson y Whitfield 1991, Matsumoto y Harbison 1993, Haddock 2007). Mediante el uso de microscopía electrónica, la morfometría del colloblasto ha sido registrada para algunas especies (Bargmann et al. 1972; Benwitz 1978; Franc 1978; Mackie et al. 1988; Emson y Whitfield 1991; Carré y Carré 1993a, b; Eeckhaut et al. 1997), pero solo un estudio ha comparado la variación de colloblastos en una pequeña porción (4 especies de 4 familias) del filo (Franc 1978). El polimorfismo de colloblastos dentro de una especie ha sido observado únicamente en *Minictena luteola* (Carré y Carré 1993b). El vocabulario asociado con los colloblastos ha sido confuso por mucho tiempo, pero von Byern et al. (2010) recientemente aclararon una terminología estándar, que es la que se utiliza en este documento (Fig. 1). El objetivo del presente estudio es examinar la diversidad de las características de los colloblastos en el filo mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (MEB) y análisis morfométricos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Veinte especies de ctenóforos fueron recolectados desde la zona epipelágica hasta la batipelágica, cerca de la costa central de California y de las islas hawaianas. Estos sitios son ventajosos por presentar ambientes muy profundos a una relativa cercanía de la costa (Haddock et al. 2017). Especies de aguas someras fueron recolectadas a mano en frascos de vidrio por buzos científicos (Haddock y Heine 2005). Especies de las zonas meso y batipelágicas fueron recolectadas utilizando muestreadores de succión y muestreadores de detritus, en vehículos operados remotamente del Instituto de Investigación del Acuario de la Bahía de Monterey (Robison 1993). Al encontrarlos extendidos en la postura de alimentación, los tentáculos fueron succionados con una pipeta Pasteur y así separados del animal. Los tentáculos retraídos en el bulbo tentacular fueron diseccionados de animales intactos utilizando pinzas de metal fino y tijeras quirúrgicas. Luego, los tentáculos fueron preparados mediante fijación primaria en el mar utilizando formalina tamponada con bórax al 4% en agua de mar filtrada. En el laboratorio, los tentáculos fueron lavados con NaHCO<sub>3</sub> al 2.5% durante 30–45 min, y la fijación secundaria se llevó a cabo utilizando OsO<sub>4</sub> al 2% en NaHCO<sub>3</sub> al 1.25% por 2–3 h dependiendo del tamaño de la muestra. Después de la fijación secundaria, los tentáculos fueron enjuagados con agua



**Figure 1.** Colloblast morphology and schematic of how morphometrics were recorded (inset). The colloblast is made up of 2 different cell types that merge in the latter stages of development. The collocyte is the primary cell that comprises the colloblast and contains a majority of the organelles that are key to the function of colloblasts during predation. Cap cells produce external secretion granules and form the cap cell membrane that covers the surface of the developing colloblast. Internal secretion granules are produced by the collocyte and are anchored to the spheroid body via the radii. The elongated nucleus is located beneath the spheroid body and extends downwards into the collopod. The spiral filament coils downwards from the spheroid body and is connected to the collopod by a thin plasma bridge that breaks away upon colloblast ejection. The root and root tendrils anchor the colloblast to the denser, inner-layer of the tentacle or tentillum.

**Figura 1.** Morfología del coloblasto y esquema de cómo se registró la morfometría (recuadro). El coloblasto está formado por 2 tipos de células diferentes que se fusionan en las últimas etapas del desarrollo. El colócito es la célula primaria que contiene al coloblasto y posee la mayoría de los organelos que son clave para el funcionamiento de los coloblastos durante la depredación. Las células externas producen los gránulos externos de secreción y forman una membrana que recubre la superficie del coloblasto en desarrollo. Los gránulos internos de secreción son producto del colócito y están anclados al cuerpo esferoidal a través de los radios. El núcleo alargado se encuentra por debajo del cuerpo esferoidal y se extiende hacia abajo metiéndose en el colópodo. El filamento espiralado se enrolla hacia abajo del cuerpo esferoidal y está conectado al colópodo por un puente delgado de plasma que se rompe al expulsar el coloblasto. La raíz y los zarcillos de la raíz anclan el coloblasto a la capa más densa e interna de los tentáculos o tentilla.

Micrographs were taken on a JEOL JSM-6480LV scanning electron microscope and morphometrics of the 3 main ultrastructural components were analyzed using ImageJ (Schneider et al. 2012). If needed, the micrograph's contrast and brightness were adjusted using linear transformations in Adobe Photoshop.

Colloisphere diameter was measured at 2 perpendicular lengths (inset in Fig. 1), one from a superior view (X) and one from a profile view (Y); all colloisphere area measurements were two-dimensional and included the external secretion granules. Colloisphere classification was determined by the colloisphere diameter ratio. The numerator of this ratio was the superior view measurement (Fig. 1 inset a), and the denominator was the profile view measurement (Fig. 1 inset b). Colloispheres with a diameter ratio of  $\sim 1.0$  were considered spheroid; a ratio of  $\sim 1.3$ , ellipsoid; and ratios of  $\sim 0.5$  or between  $\sim 1.1$  and  $1.2$ , non-uniform. External secretion granule diameter was measured at 2 perpendicular lengths, and the two-dimensional area was measured only on granules that did not appear "deflated" or "popped". The spiral filament cross section was measured at multiple points perpendicular to the central axis of the filament. Cross sections of tentacles, tentilla, and colloblasts were observed on specimens that were prepared using the dry-fracturing technique (Toda et al. 1989).

## RESULTS

Colloisphere and external secretion granule measurements were successfully made on all 20 species; however, spiral filament morphometrics were only recorded for 13 species due to no visible extended colloblasts, or unsuccessful dry-fracturing (Table 1). Three variations of colloisphere form, spherical (Fig. 2), ellipsoidal (Fig. 3), and non-uniform (Fig. 4), were found. Colloblasts were observed to either have or not have a thin cap cell membrane covering the colloispheres, including the external secretion granules. External secretion granules were deposited by the cap cell in either a single cluster covering the surface of the colloisphere or in 1 of 3 patterned granule deposition forms.

### Colloisphere morphologies and spiral filaments

Of the 20 species examined, 13 had spherical colloispheres, 2 had ellipsoidal colloispheres, and 5 had colloispheres that took other non-uniform shapes (Table 1, Figs. 2–4). Spiral filaments were observed in ctenophores with spherical (Fig. 2) and ellipsoidal (Fig. 3) colloispheres. For spherical colloispheres, the spiral filament was covered by the collocyte membrane and coiled around the collopod, connected via the plasma bridge (Figs. 1, 2). For ellipsoidal colloispheres, the spiral filament was attached to the narrow end of the ellipsoid, and no distinct collopod was observed protruding from the colloisphere as was present in spherical colloispheres (Fig. 3).

desionizada hasta que la solución resultó límpida. Los tentáculos fueron deshidratados mediante un gradiente de etanol utilizando cápsulas de Reichert, secados por punto-crítico en dióxido de carbono/acetona utilizando SAMDRI-PVT-3D, y luego sometidos a pulverización catódica con oro blanco utilizando un HUMMER 6.2. Las micrografías fueron tomadas en un JEOL JSM-6480LV (microscopio electrónico de barrido), y la morfometría de los 3 componentes ultraestructurales principales fueron analizados utilizando ImageJ (Schneider et al. 2012). Cuando hubo necesidad, el contraste y el brillo de las micrografías fueron ajustados mediante transformaciones lineales en Adobe Photoshop.

El diámetro de la coloesfera se midió en 2 longitudes perpendiculares (ver inserto en Fig. 1), uno desde una vista superior (X) y uno desde una vista de perfil (Y); todas las mediciones del área de la coloesfera fueron bidimensionales e incluyeron los gránulos externos de secreción. La clasificación de las coloesferas fue determinada por la relación entre el diámetro de las mismas. El numerador de esta relación fue la medición de la vista superior (inserto a en Fig. 1), y el denominador fue la medición de la vista de perfil (inserto b en Fig. 1). Las coloesferas con una relación de diámetro de  $\sim 1.0$  fueron consideradas esféricas; las de una relación de  $\sim 1.3$ , elipsoides; y las de relaciones de  $\sim 0.5$  o entre  $\sim 1.1$  y  $1.2$ , no uniformes. El diámetro de los gránulos externos de secreción se midió en 2 longitudes perpendiculares, y el área bidimensional se midió solamente en los gránulos que no parecían estar "desinflados" o "reventados". La sección transversal del filamento espiral se midió en múltiples puntos perpendiculares al eje central del filamento. Se observaron secciones transversales de tentáculos, tentillas y coloblastos en muestras que fueron preparadas utilizando la técnica de fractura en seco (Toda et al. 1989).

## RESULTADOS

Se tomaron de manera exitosa las medidas de las coloesferas y de los gránulos externos de secreción en las 20 especies. Sin embargo, la morfometría del filamento espiralado solo fue registrado en 13 especies debido a la ausencia de coloblastos visiblemente extendidos o a una fractura en seco ineficaz (Tabla 1). Se encontraron 3 variaciones en la forma de la coloesfera, esférica (Fig. 2), elipsoide (Fig. 3) y no uniforme (Fig. 4). Algunos de los coloblastos observados presentaban una delgada membrana de células externas que cubría la coloesfera (incluso los gránulos externos de secreción), mientras que otros no. Los gránulos externos de secreción fueron depositados por las células externas en un solo cúmulo que cubría la superficie de la coloesfera o en 1 de los 3 patrones de formas de deposición.

### Morfología de la coloesfera y de los filamentos espiralados

De las 20 especies examinadas, 13 tenían coloesferas esféricas, 2 tenían coloesferas elipsoides y 5 tenían coloesferas

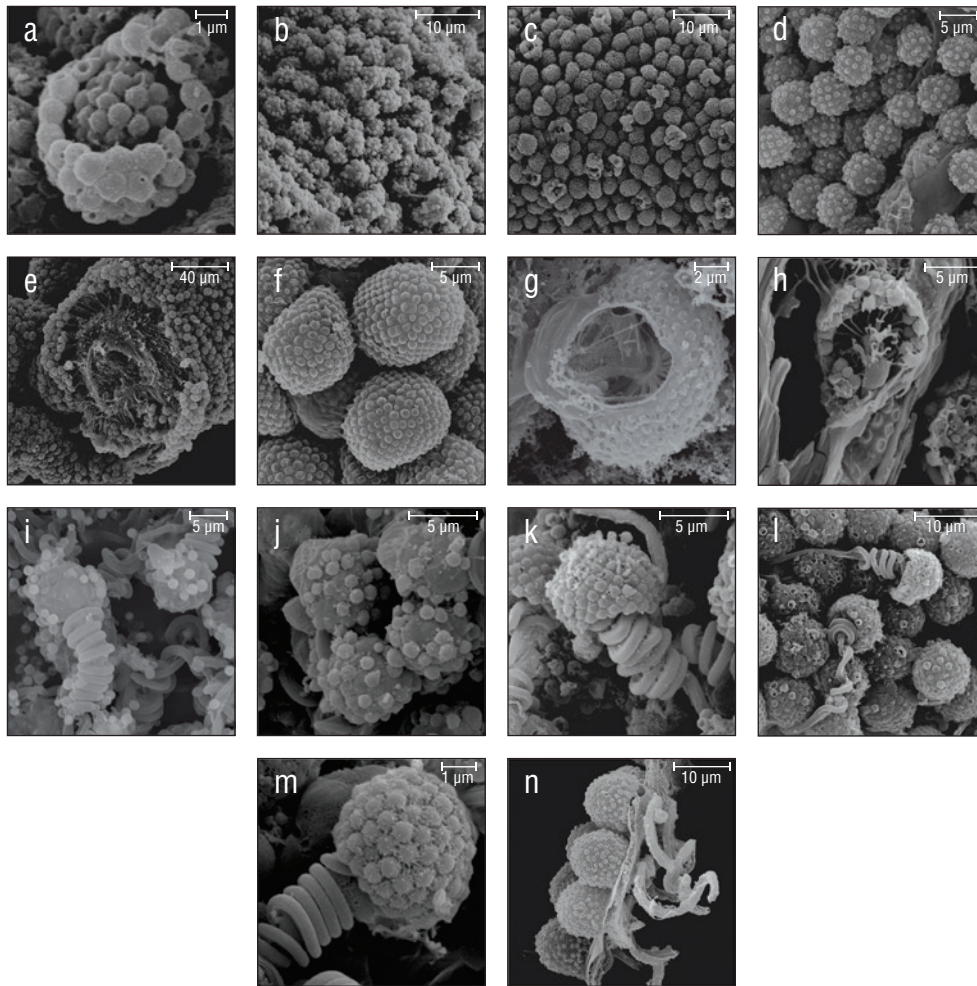
**Table 1.** Morphometrics of colloblasts in ctenophores.  
**Tabla 1.** Morfometría de los coloblastos en ctenóforos.

Species	Collection location	Collection ID	Spiral filament cross section ( $\mu\text{m}$ )	External granule area ( $\mu\text{m}^2$ )	External granule diameter <sup>d</sup> ( $\mu\text{m}$ )	External granule diameter <sup>b</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Secretion granule deposition form	Collosphere area ( $\mu\text{m}^2$ )	Collosphere diameter <sup>x</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Collosphere diameter <sup>y</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Collosphere classification
Aulacoctenidae											
<i>Aulacoctena</i> sp. 1 (Fig. 3a, b; 7c)	California	D1046-D4	2.2 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	Patterned	116.0 $\pm$ 15.0	11.0 $\pm$ 1.7	8.6 $\pm$ 1.6	Ellipsoid
Aulacoctenidae											
<i>Aulacoctena</i> sp. 2 (Fig. 3c, 7d)	California	D1168-D3	1.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	Patterned	80.0 $\pm$ 8.1	11.0 $\pm$ 0.8	8.5 $\pm$ 0.5	Ellipsoid
Bathycytenidae											
<i>Bathycytena chuni</i> (Fig. 2a)	Hawaii	KM18-T08-3	0.4 $\pm$ 0.03	1.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	Clustered	44.0 $\pm$ 5.5	7.1 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.2	Spheroid
Mertensiidae											
<i>Callianira</i> sp. (Fig. 2b)	Hawaii	KM-M123-MS3	Not visible	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	Clustered	13.0 $\pm$ 2.2	4.1 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.4	Spheroid
Undescribed Family											
<i>Cydippid</i> sp. C (Fig. 4e, 5, 6a)	California	D1162-D2	0.9 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	Clustered	16.0 $\pm$ 5.8	3.0 $\pm$ 0.5	5.8 $\pm$ 1.4	Non-uniform
Pleurobrachiidae											
<i>Hormiphora palmata</i> (Fig. 2c, 6b)	Hawaii	KM18-BW2-5	Not visible	0.4 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	Clustered	10.0 $\pm$ 1.4	3.5 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.3	Spheroid
Pleurobrachiidae											
<i>Pleurobrachia bachei</i> (Fig. 2d, e; 7a)	California	24Mar19-BW2-36, 37, 38	0.5 $\pm$ 0.06	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	Patterned	28.0 $\pm$ 2.5	6.1 $\pm$ 0.2	5.7 $\pm$ 0.3	Spheroid
Undescribed Family											
<i>Cydippid</i> sp. RLL (Fig. 5f)	California	D1022-D4	Not visible	0.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	Clustered	20.0 $\pm$ 3.4	3.3 $\pm$ 0.1	6.4 $\pm$ 0.7	Non-uniform
Undescribed Family											
<i>Cydippid</i> sp. RC (Fig. 2f)	California	D1168-D7	Not visible	0.9 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	Clustered	87.0 $\pm$ 14	11.0 $\pm$ 0.7	10.0 $\pm$ 1.6	Spheroid
Undescribed Family											
<i>Cydippid</i> sp. RH (Fig. 2g)	Hawaii	KM18-M120-MS4	0.9 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	Clustered	83.0 $\pm$ 10	9.8 $\pm$ 0.9	9.6 $\pm$ 1.2	Spheroid
Undescribed Family											
<i>Cydippid</i> sp. M (Fig. 2h)	Hawaii	KM18-M121-MS4	1.3 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2	Clustered	90.0 $\pm$ 9.9	10.2 $\pm$ 0.8	10.0 $\pm$ 0.7	Spheroid

Table 1 (Cont.)

Species	Collection location	Collection ID	Spiral filament cross section ( $\mu\text{m}$ )	External granule area ( $\mu\text{m}^2$ )	External granule diameter <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}$ )	External granule diameter <sup>b</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Secretion granule deposition form	Collosphere area ( $\mu\text{m}^2$ )	Collosphere diameter <sup>x</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Collosphere diameter <sup>y</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Collosphere classification
Tjalfeiliidae Platyctene sp. P (Fig. 2f)	California	D1165-D10	1.0 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	Clustered	52.0 $\pm$ 5.7	9.1 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 0.1	Spheroid
Tjalfeiliidae Platyctene sp. W (Fig. 2j)	California	D1165-BT1	0.4 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	Clustered	16.0 $\pm$ 2.7	4.4 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.4	Spheroid
Lampoctenidae Lobate sp. V (Fig. 4c, 6c, 7f)	California	D1045-D4	Not visible	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	Patterned	50.0 $\pm$ 9.0	5.1 $\pm$ 0.7	11.0 $\pm$ 1.5	Non-uniform
Undescribed Family Cydippid sp. B (Fig. 2k)	California	D1019-D1, D6	0.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	Clustered	63.0 $\pm$ 6.5	8.6 $\pm$ 0.6	8.4 $\pm$ 0.6	Spheroid
Euplokamididae Euplokamis sp. (Fig. 2l, 7b)	California	D1169-D4	0.5 $\pm$ 0.04	1.5 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1	13.0 $\pm$ 0.1	Patterned	65.0 $\pm$ 4.1	8.9 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 0.6	Spheroid
Cestidae Cestum veneris (Fig. 4a)	Hawaii	KM18-BW8-21	Not visible	0.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	Clustered	38.0 $\pm$ 5.1	7.0 $\pm$ 1.3	6.2 $\pm$ 0.9	Non-uniform
Leucotheidae Leucothea pulchra (Fig. 4b)	Monterey Bay Aquarium	28Apr19-TT1, 2	Not visible	1.5 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	Clustered	22.0 $\pm$ 2.8	5.3 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.6	Non-uniform
Mertensiidae Mertensid sp. Y (Fig. 2m)	California	D1137-D3	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	Clustered	45.0 $\pm$ 5.0	7.4 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.4	Spheroid
Undescribed Family Cydippid sp. RG (Fig. 2n, 6e)	California	D1165-D7, D9	1.7 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	Patterned	92.0 $\pm$ 9.0	10.0 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 0.3	Spheroid





**Figure 2.** Species with spherical collospheres. (a) *Bathytectena chuni*. (b) *Callianira* sp. (c) *Hormiphora palmata*. (d) *Pleurobrachia bachei*. (e) Cross section of *P. bachei* tentillum showing the double-layered tentacle morphology. (f) *Cydippid* sp. RC. (g) Cross section of *Cydippid* sp. RH colloblast with nucleus, spheroid body, and radii visible. (h) Cross section of *Cydippid* sp. M colloblast with a majority of organelles visible. (i) *Platytectene* sp. P. (j) *Platytectene* sp. W. (k) *Cydippid* sp. B. (l) *Euplokamis* sp. (m) *Mertensiid* sp. Y. (n) *Cydippid* sp. RG.

**Figura 2.** Especies con coloesferas esféricas. (a) *Bathytectena chuni*. (b) *Callianira* sp. (c) *Hormiphora palmata*. (d) *Pleurobrachia bachei*. (e) Sección transversal de las tentillas de *P. bachei*, que muestra la morfología del tentáculo de doble capa. (f) *Cydippid* sp. RC (cidípido). (g) Sección transversal del coloblasto de *Cydippid* sp. RH, que muestra el núcleo, el cuerpo esférico y los radios. (h) Sección transversal del coloblasto de *Cydippid* sp. M, que muestra la mayoría de los organelos. (i) *Platytectene* sp. P (platicténido). (j) *Platytectene* sp. W. (k) *Cydippid* sp. B. (l) *Euplokamis* sp. (m) *Mertensiid* sp. Y. (n) *Cydippid* sp. RG.

For non-uniform collospheres, spiral filaments were only observed in cydippid species C (henceforth *Cydippid* sp. C as in Table 1) when the tentacles were draped across the swimming legs of a copepod (Fig. 5). Spiral filaments were seen stretching more than 200  $\mu\text{m}$  from one entangled swimming leg to another (Fig. 5b), compared to the external secretion granule diameter of roughly 0.8  $\mu\text{m}$  (Table 1). Non-uniform collosphere morphometrics were only recorded from a superior view due to the lack of the traditional colloblast form observed from a profile view. Collospheres of lobate species V (henceforth *Lobate* sp. V as in Table 1) were elongated and anchored to the oral tentilla along the collosphere's longer axis (Fig. 4c, d). No spiral filaments were observed in *Lobate* sp. V.

no uniformes (Tabla 1, Figs. 2–4). Los filamentos espiralados fueron observados en ctenóforos con coloesferas esféricas (Fig. 2) y elipsoides (Fig. 3). En las coloesferas esféricas, el filamento espiralado estaba cubierto por la membrana del colócito y enrollado sobre el colópodo, conectados por el puente plasmático (Figs. 1, 2). En las coloesferas elipsoides, el filamento espiralado se conectaba con la punta estrecha del elipsoide, sin poder distinguir un colópodo saliéndose de la coloesfera como se presentaba en la coloesfera esférica (Fig. 3). En las coloesferas no uniformes, los filamentos espiralados sólo fueron observados en la especie de cidípido C (en adelante *Cydippid* sp. C como en la Tabla 1), cuando los tentáculos envolvían los apéndices torácicos (Fig. 5). Los filamentos espiralados se observaron estirándose más

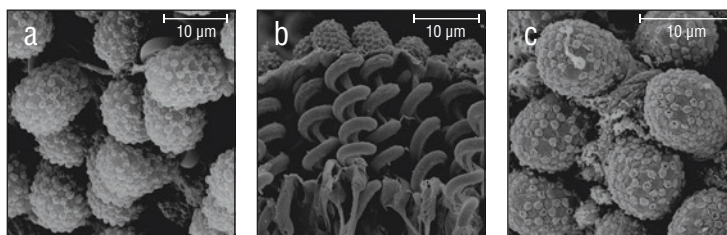
### Cap cell membrane

The cap cell membrane, a thin membrane of cells that contain the external secretion granules awaiting deposition onto the collosphere, was observed in *Hormiphora palmata*, *Cydippid* sp. C, and *Lobate* sp. V (Fig. 6). In *Cydippid* sp. C, the cap cell membrane was very smooth and tightly enveloped the surface of the collosphere (Fig. 6a). The areas that lacked the cap cell membrane had indistinct collospheres with external granule deposition similar to those seen in *H. palmata*. In *H. palmata*, the cap cell membrane had folds throughout its surface (Fig. 6b). On areas of the tentacles of *H. palmata* where this membrane was absent, granules were deflated and less prominent than those found in other species lacking the cap cell membrane (Fig. 2c), suggesting it may have been torn free and the colloblast had adhered. In *Lobate* sp. V the cap cell membrane does not completely

de 200  $\mu\text{m}$ , desde un apéndice torácico enredado hasta otro (Fig. 5b), comparado con el diámetro de la glándula de secreción externa de aproximadamente 0.8  $\mu\text{m}$  (Tabla 1). La morfometría de las coloesferas no uniformes fue registrada únicamente desde una vista superior debido a la falta del formato tradicional del coloblasto observable desde una vista de perfil. Las coloesferas de la especie de lobato V (en adelante *Lobate* sp. V como en la Tabla 1) estaban elongadas y ancladas a las tentílas orales sobre el eje más largo de la coloesfera (Fig. 4c, d). No se observaron filamentos espiralados en *Lobate* sp. V.

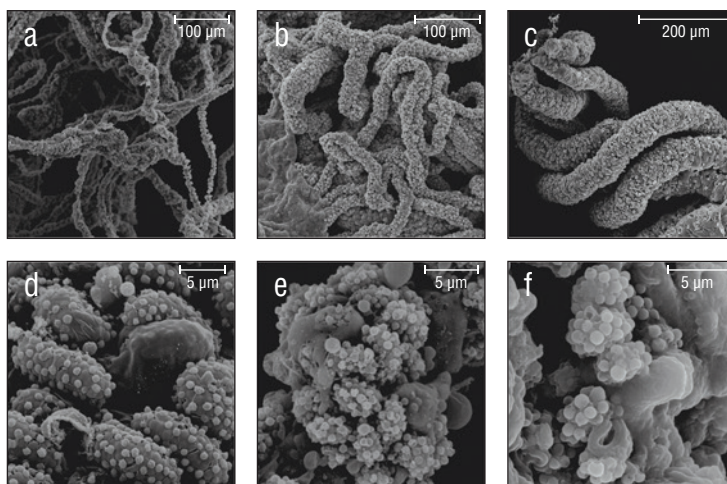
### Membrana de células externas

La membrana de células externas, una delgada membrana de células que contiene los gránulos externos de secreción en espera de ser depositados sobre la coloesfera, fue



**Figure 3.** Species with ellipsoidal collospheres. (a) *Aulacoctena* sp. 1. (b) Profile view of *Aulacoctena* sp. 1 colloblasts showing the spiral filament and root, but lacking the collopod in the middle of the spiral. (c) *Aulacoctena* sp. 2.

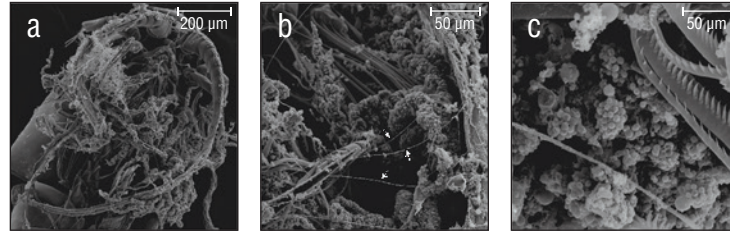
**Figura 3.** Especies con coloesferas elipsoides. (a) *Aulacoctena* sp. 1. (b) Vista de perfil de coloblastos de *Aulacoctena* sp. 1, que muestra el filamento espiralado y la raíz, pero carece del colópodo en el medio del espiral. (c) *Aulacoctena* sp. 2.



**Figure 4.** Species with non-uniform collospheres. (a) Wispy oral tentilla of *Cestum veneris*. (b) Clump of 4 trailing tentacles from *Leucothea pulchra*. (c) Oral tentilla from a mature *Lobate* sp. V. (d) Oblong colloblasts from *Lobate* sp. V. (e) Indistinct colloblasts of *Cydippid* sp. C. (f) Indistinct, loop-like collospheres found in *Cydippid* sp. RLL.

**Figura 4.** Especies con coloesferas no uniformes. (a) Tentílas orales ligeras de *Cestum veneris*. (b) Un grupo de 4 tentáculos colgantes de *Leucothea pulchra*. (c) Tentílas orales de un *Lobate* sp. V. (lobato) maduro. (d) Coloblastos apaisados de *Lobate* sp. V. (e) Coloblastos indistintos de *Cydippid* sp. C (cidípido). (f) Coloesferas indistintas y con forma de bucle encontradas en *Cydippid* sp. RLL.





**Figure 5.** Tentacles of *Cydippid* sp. C entangled in the swimming legs of a copepod. (a) Underside of copepod with swimming legs visible. (b) Zoomed view of the tentilla. Spiral filaments (arrows) visible stretching roughly 200  $\mu\text{m}$  across the swimming legs of the copepod. (c) Colloblasts near the point of contact between the tentilla and the swimming legs of the copepod.

**Figura 5.** Tentáculos de *Cydippid* sp. C enredados en los apéndices torácicos de un copépodo. (a) Parte inferior del copépodo con apéndices torácicos visibles. (b) Vista ampliada de tentillas. Filamentos espiralados (flechas) estirándose aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  por sobre los apéndices torácicos del copépodo. (c) Coloblastos cercanos al punto de contacto entre las tentillas y los apéndices torácicos del copépodo.

cover areas of the oral tentilla, and collospheres and external secretion granules can be seen protruding through the cap cell membrane (Fig. 6c).

#### External secretion granule deposition forms

Of the 20 species examined, 14 species had a continuous cluster of external secretion granules covering the collosphere, and 6 species had 1 of 3 patterned deposition forms (Table 1, Fig. 7). Those with clustered granule deposition forms had little to no space separating the external secretion granules. Those with patterned deposition forms had external secretion granules that were deposited in separated, sometimes geometric, patterns. *Aulacoctena* sp. 1 (Figs. 3a, b; 7c), *Aulacoctena* sp. 2 (Figs. 3c, 7d), and *Cydippid* sp. RG (Fig. 2n) all have external secretion granule deposition patterns resembling a truncated icosahedron, that is, a three-dimensional shape consisting of 12 regular pentagons set edge to edge with 20 regular hexagons to complete the solid. *Pleurobrachia bachei* and an undescribed *Euplokamis* sp. have external secretion granules that were deposited in a harlequin pattern, with the external secretion granules located at the vertices of the diamond shapes comprising the pattern (Fig. 7a, b). *Lobate* sp. V has patterned granule deposition, but the pattern is not as apparent as it is in other species (Fig. 7f). External secretion granules were separated and creases were observed leading from one granule to another across the collocyte membrane (Fig. 7f). Both species of undescribed Tjalffiellidae (benthic platyctenes) have external secretion granules that are clustered and were observed to detach from the collosphere, with the internal secretion granules seen protruding from beneath (Fig. 2i, j). The detachment of external secretion granules was not observed in any of the other species in this study.

#### DISCUSSION

The term colloblast is somewhat of a misnomer, because it implies that the structure is composed of only one cell.

observada en *Hormiphora palmata*, *Cydippid* sp. C, y *Lobate* sp. V (Fig. 6). En los *Cydippid* sp. C, la membrana de células externas era lisa y envolvía de manera firme la superficie de la coloesfera (Fig. 6a). Las áreas que carecían de la membrana tenían coloesferas indistintas con una disposición de gránulos externos similares a los observados en *H. palmata*. En *H. palmata*, la membrana de células externas tenía pliegues a lo largo de su superficie (Fig. 6b). En algunas partes de los tentáculos de *H. palmata* donde esta membrana estaba ausente, los gránulos estaban desinflados y eran menos prominentes que aquellos encontrados en especies que carecen de la membrana de células externas (Fig. 2c), lo cual puede sugerir que se haya desgarrado y el coloblasto se haya adherido. En *Lobate* sp. V la membrana de células externas no cubre completamente las áreas de las tentillas orales, y pueden observarse las coloesferas y los gránulos externos de secreción sobresaliendo a través de dicha membrana (Fig. 6c).

#### Formas de deposición de los gránulos externos de secreción

De las 20 especies examinadas, 14 especies presentaban un cúmulo continuo de gránulos externos de secreción que cubría la coloesfera, y 6 especies tenían 1 de los 3 patrones de deposición (Tabla 1, Fig. 7). Aquellas que presentaban una forma de deposición de los gránulos externos de secreción en cúmulo tenían poco o nada de espacio entre los gránulos. Aquellas que presentaban la forma de deposición en patrón tenían gránulos externos de secreción que estaban depositados en patrones separados, a veces geométricos. *Aulacoctena* sp. 1 (Figs. 3a, b; 7c), *Aulacoctena* sp. 2 (Figs. 3c, 7d), and *Cydippid* sp. RG (Fig. 2n) tienen patrones de deposición que se asemejan a un icosaedro truncado, una figura tridimensional que consta de 12 pentágonos regulares colocados lado a lado, con 20 hexágonos regulares completando el sólido. Tanto *Pleurobrachia bachei* como una especie no descrita de *Euplokamis* tienen gránulos externos de secreción que fueron depositados en un patrón de arlequín, con gránulos externos

However, the colloblast is actually formed from multiple cells: the collocyte, which forms the main body of the colloblast, along with numerous cap cells that produce external secretion granules (reviewed by von Byern et al. 2010). Cap cells form a membrane that covers the developing colloblasts on the tentacles. This unique structure separates ctenophores from all other known organisms (see Dunn et al. 2015). Interestingly, at least 2 genera of tentaculate ctenophores have apparently lost the ability to produce colloblasts. These are *Haeckelia* (Carré and Carré 1980, Mills and Miller 1984) and the curious monotypic genus *Ctenella* (Carré and Carré 1993a).

### General collosphere morphology

Prior to this study, collospheres had been described as hemispherical across the phylum. Observed herein, a majority of collosphere shapes are closer to resembling a sphere rather than a hemisphere. Two other collosphere forms, ellipsoid and non-uniform, were also observed to exist in a few families. In families with these 2 forms of collospheres, colloblasts lack a traditional collopod. Since the collopod is the location of the elongated nucleus and serves as an anchor point for the resting spiral filament, this finding piques interest surrounding the formation and function of such variations during collosphere morphogenesis.

### Spiral filaments

The majority of spiral filament observations in this study agree with those reported in previous studies, which have shown that spiral filaments in resting colloblasts are arranged in a helical coil and maintain this helical form in ejected colloblasts, albeit as a looser coil. It has also been observed that the diameter of the spiral filament cross section does not vary from its resting state and ejected state. A previous study using transmission electron microscopy (TEM) found spiral filaments to be present and coiled once

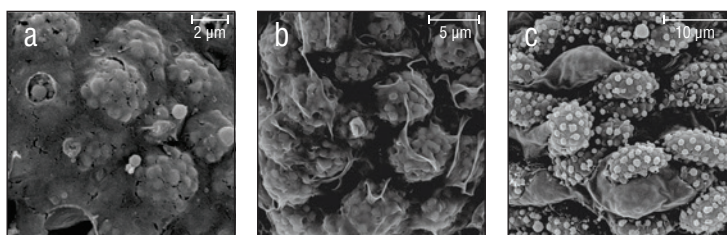
de secreción en las puntas de los diamantes que comprometerían la figura (Fig. 7a, b). Lobate sp. V presenta una deposición de gránulos en patrón, pero el patrón no es tan evidente como en las otras especies (Fig. 7f). Los gránulos externos de secreción se encontraban separados, y se observaban pliegues desde un gránulo a otro a lo largo de la membrana del colócito (Fig. 7f). Ambas especies no descritas de Tjalfiellidae (platicténidos béntonicos) tienen gránulos externos de secreción en cúmulo y se observó que se desprendían de la coloesfera, con gránulos internos de secreción que sobresalían por debajo (Fig. 2i, j). El desprendimiento de los gránulos externos de secreción no se observó en ninguna otra especie en este estudio.

### DISCUSIÓN

El término coloblasto es un nombre poco apropiado, ya que implica que la estructura se compone de una sola célula. Sin embargo, el coloblasto se forma a partir de múltiples células: el colócito, que conforma el cuerpo principal del coloblasto, además de las numerosas células externas que producen los gránulos externos de secreción (revisado por von Byern et al. 2010). Las células externas forman una membrana que recubre los coloblastos que se encuentran desarrollándose sobre los tentáculos. Esta estructura única separa los ctenóforos de todos los demás organismos hasta ahora conocidos (ver Dunn et al. 2015). Curiosamente, al menos 2 géneros de ctenóforos tentaculados aparentemente han perdido la capacidad de producir coloblastos. Estos son *Haeckelia* (Carré y Carré 1980, Mills y Miller 1984) y el curioso género monotípico *Ctenella* (Carré and Carré 1993a).

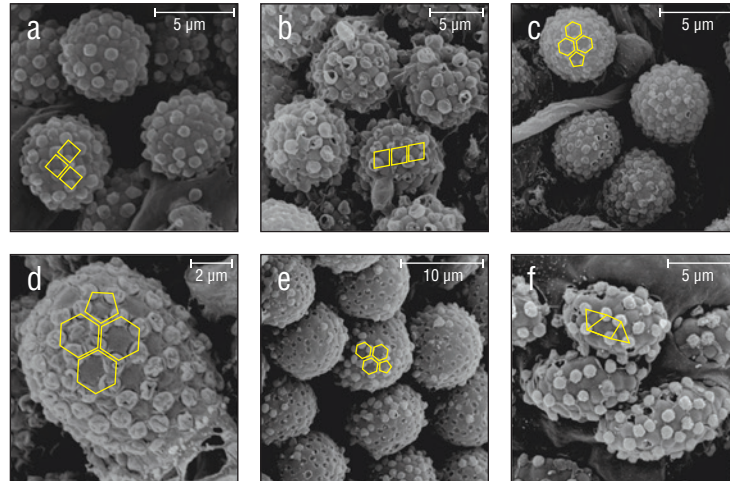
### Morfología general de la coloesfera

Previo a este estudio, las coloesferas habían sido descritas como hemisféricas en todo el filo. Se observa aquí que la mayoría de las formas de la coloesfera se asemejan más a una esfera que a una semiesfera. También se observó la



**Figure 6.** Cap cell membranes in the senescent stage. (a) Smooth cap cell membrane with external secretion granules visible beneath the surface found in *Cydippid* sp. C. (b) *Hormiphora palmata* cap cell membrane visible as folds atop the collospheres. (c) Oblong colloblasts of *Lobate* sp. V can be seen protruding from the degenerating cap cell membrane.

**Figura 6.** Membrana de células externas en el estadio senescente. (a) Membrana de células externas lisa y con gránulos externos de secreción visibles bajo la superficie, encontrada en *Cydippid* sp. C (cidípido). (b) Membrana de células externas de *Hormiphora palmata* visiblemente plegada sobre las coloesferas. (c) Pueden verse coloblastos apaisados de *Lobate* sp. V (lobato) sobresaliendo de la membrana de células externas en proceso de degeneración.



**Figure 7.** Geometric external secretion granule deposition patterns found in 3 families and an undescribed cydippid. Patterns are overlaid in yellow. (a) Harlequin deposition pattern found in *Pleurobrachia bachei*. The same deposition pattern is found in (b) *Euplokamis* sp. (c) Truncated icosahedron-like deposition pattern found in *Aulacoctena* sp. 1. Popped and deflated external secretion granules can be seen throughout the surface of the collosphere. The same deposition pattern and popping or deflation of granules is present in (d) *Aulacoctena* sp. 2 and (e) *Cydippid* sp. RG. (f) The granule deposition pattern of *Lobate* sp. V is separated, but not as geometrically uniform. Creases are visible on the surface of the colloblast membrane.

**Figura 7.** Patrones geométricos de deposición de los gránulos externos de secreción encontrados en 3 familias y un cidípido no descrito. Los patrones están superpuestos en amarillo. (a) Patrón arlequín de deposición encontrado en *Pleurobrachia bachei*. El mismo patrón de deposición se encuentra en (b) *Euplokamis* sp. (c) Patrón icosaedro truncado de deposición encontrado en *Aulacoctena* sp. 1. Pueden verse gránulos externos de secreción reventados y desinflados por sobre la superficie de la coloesfera. El mismo patrón de deposición, como también gránulos externos de secreción reventados y desinflados, se encuentra en (d) *Aulacoctena* sp. 2 y (e) *Cydippid* sp. RG (cidípido). (f) El patrón de deposición de *Lobate* sp. V (lobato) está separado, pero no es tan geoméricamente uniforme. Pueden verse pliegues en la superficie de la membrana del colóbico.

or twice in *Cestum veneris* and 6 to 7 times in *Leucothea multicornis* (Franc 1978). This is not consistent with spiral filament observations of *C. veneris* and *Leucothea pulchra* in the current study. The lack of spiral filaments for these 2 species could hint at potential variation in spiral filament form due to other factors, such as feeding behaviors. More research into the presence and function of spiral filaments is necessary to understand colloblast morphology as a whole.

### Cap cell membrane

Collosphere morphogenesis has 3 stages (Storch and Lehnert-Moritz 1974, Mackie et al. 1988, von Byern et al. 2010). The electron-dense external secretion granules covering the collospheres are not derived from the collospheres themselves but instead are deposited by separate cells referred to synonymously as cap cells, accessory cells, covering cells, or support cells (Benwitz 1978, Mackie et al. 1988, Eeckhaut et al. 1997, Babonis et al. 2018). These cap cells form a membrane that covers the outside of the tentacles. During stage three of colloblast development, the cap cell membrane senesces and degenerates, revealing the external secretion granules on the active collospheres beneath. The micrographs herein taken of *H. palmata*, *Cydippid* sp. C, and *Lobate* sp. V show this membrane imaged via SEM. In this study, the absence of the cap cell membrane in almost

existencia, en algunas familias, de otras 2 formas de coloesferas, elipsoides y no uniformes. En las familias con estas 2 formas de coloesferas, los coloblastos carecen de un colópodo tradicional. Dado que el colópodo es donde se localiza el núcleo alargado y sirve como punto de anclaje para el filamento espiralado en reposo, este hallazgo despierta el interés en torno a la formación y la función de tales variaciones durante la morfogénesis de las coloesferas.

### Filamentos espiralados

La mayoría de las observaciones de los filamentos espiralados de este estudio concuerdan con aquellas reportadas en estudios previos, las cuales indican que los filamentos espiralados de coloblastos en reposo están dispuestos en una espiral helicoidal y mantienen esta forma helicoidal en coloblastos expulsados, aunque como una espiral más suelta. También se ha observado que el diámetro de la sección transversal del filamento espiralado no varía desde su estado de reposo a su estado expulsado. Un estudio previo que usó microscopía electrónica de transmisión (MET) halló filamentos espiralados presentes y enrollados 1 o 2 veces en *Cestum veneris* y 6 o 7 veces en *Leucothea multicornis* (Franc 1978). Esto no es consistente con las observaciones de filamentos espiralados de *C. veneris* y *Leucothea pulchra* en el presente estudio. La falta de filamentos espiralados



all micrographs is likely due to the mature stage of tentacle development at the time of collection and not a characteristic of that species throughout development.

### External secretion granules

Benwitz (1978) was the first scientist to deduce that external secretion granules are produced by cap cells instead of the collocyte. This observation was later confirmed by Mackie et al. (1988). Patterns of external secretion granule deposition are not possible to visualize clearly using TEM. In the present SEM study, several patterns were observed. The external secretion granule deposition form resembling a harlequin pattern found in *P. bachei* and an undescribed *Euplokamis* sp. shows that similar granule patterns can exist across families. This stands true even when referring to the truncated icosahedron-like external secretion granule deposition pattern that is found in the genus *Aulacoctena* and the undescribed family containing *Cydippid* sp. RG.

The patterned granule deposition forms of *P. bachei*, *Euplokamis* sp., both *Aulacoctena* species, *Cydippid* sp. RG, and *Lobate* sp. V demonstrate that external secretion granules are anchored to the collosphere in the areas between the bulges of the internal secretion granules. Mechanisms of external granule attachment by the cap cells are unknown but are likely a factor of the geometric patterns present during metazoan epithelial morphogenesis (Gibson et al. 2006).

The contents of the external secretion granules are unknown. Most authors contend that an adhesive is contained within these granules; however, in the present study no material was observed when these granules were broken open. The copepod that we observed was clearly entangled with spiral filaments, indicating they play an important role in prey capture. No sign of adhesive material was observed on the copepod itself, the filaments, or on the surface of the collosphere. Research into ctenophore tentacles has suggested that the colloblast adhesive contains a DOPA-like catecholic compound (Townsend and Sweeney 2019), and molecular studies indicate the colloblast adhesive is unique to the phylum Ctenophora (Babonis et al. 2018).

### Colloblasts in mature Lobata

Ctenophores in the order Lobata have tentacles in the larval stage, and these tentacles possess colloblasts (Borisenko and Ereskovsky 2013). Little is known about the senescence of colloblasts on the feeding tentacles during the transition from larval stage to maturity, when elongated feeding tentacles are succeeded by a fringe of oral tentacles. Micrographs (Figs. 4c, d; 6c; 7f) of the oral tentacles found on mature *Lobate* sp. V revealed that colloblasts are present despite the loss of traditional prey-capturing tentacles. The absence of spiral filaments in the colloblasts on the oral tentilla in this species implies that spiral filaments are not

para estas 2 especies podría indicar una posible variación en el estado del filamento espiralado debido a factores como los comportamientos alimentarios. Es necesario seguir investigando sobre la presencia y el funcionamiento de los filamentos espiralados para comprender la morfología del coloblasto en su conjunto.

### Membrana de células externas

La morfogénesis de la coloesfera tiene 3 etapas (Storch y Lehnert-Moritz 1974, Mackie et al. 1988, von Byern et al. 2010). Los gránulos externos de secreción densos a los electrones que recubren la coloesfera no son derivados de la coloesfera en sí, sino que son depositados por células separadas denominadas células externas, células accesorias, células de la tapa o células de soporte (Benwitz 1978, Mackie et al. 1988, Eeckhaut et al. 1997, Babonis et al. 2018). Estas células externas forman una membrana que recubre el exterior de los tentáculos. Durante la tercera etapa de desarrollo de los coloblastos, esta membrana envejece y se degenera, dejando al descubierto los gránulos externos de secreción que se encontraban debajo. Las micrografías aquí capturadas de *H. palmata*, *Cydippid* sp. C y *Lobate* sp. V, muestran imágenes de esta membrana obtenidas mediante MEB. En este estudio, la ausencia de la membrana de células externas en casi todas las micrografías probablemente se deba a la etapa madura del desarrollo en la cual el tentáculo fue recogido y no a una característica de esa especie durante todo su desarrollo.

### Gránulos externos de secreción

Benwitz (1978) fue el primer científico en deducir que los gránulos externos de secreción son producidos por las células externas y no por el colócito. Esta observación luego fue confirmada por Mackie et al. (1988). Los patrones de deposición de los gránulos externos de secreción no pueden visualizarse claramente usando MET. En el presente estudio con MEB pudieron observarse varios patrones. La forma de deposición de los gránulos externos de secreción que se asemeja al patrón de arlequín encontrado en *P. bachei* y una especie no descrita de *Euplokamis* demuestra el hecho de que pueden existir patrones de deposición de gránulos similares en una misma familia. Esto mantiene su veracidad para el patrón de deposición de gránulos externos de secreción de tipo icosaedro truncado que se encuentra en el género *Aulacoctena* y la familia no descrita que contiene al *Cydippid* sp. RG.

Los patrones de la forma de deposición de *P. bachei*, *Euplokamis* sp., ambas especies de *Aulacoctena*, *Cydippid* sp. RG y *Lobate* sp. V demuestran que los gránulos externos de secreción están anclados a la coloesfera en las áreas entre las protuberancias de los gránulos internos de secreción. Se desconocen los mecanismos de unión de los gránulos externos por las células externas, pero es probable que sean



needed to secure prey during the short transition time from capture by oral tentilla to ingestion.

## Conclusions

Although a majority of the species in our study possess spheroid colloblasts with a singular cluster of external secretion granules covering the collosphere, differences in colloblast ultrastructure can be used to examine functional diversity in the phylum Ctenophora. Ctenophores have specialized and diversified to consume a wide variety of prey, and there are both generalists and specialists (Haddock 2007, Choy et al. 2017). Our current understanding of adaptations to capture specific prey, however, is based mainly on organism-scale morphology and behavior. The potential to add ultrastructural information could greatly enhance our ability to detect co-evolution of predation strategies and prey characteristics. This is particularly promising in the species that do not adhere to the simple paradigm of casting a sticky net to catch crustaceans. The diets of species without side branches on their tentacles appear to be either specialized (narcomedusae for *Haekelia*, larvaceans for *Dryodora*) or unknown (*Aulacoctena* and some deep benthic species). Colloblasts possessed by the genus *Aulacoctena* stand out due to their ellipsoidal collosphere and truncated icosahedron-like external secretion granule pattern. Despite lacking tentilla, the tentacles of *Aulacoctena* species are particularly sticky (personal observations). Although we surveyed a broad swath of ctenophore diversity, it would still be of interest to examine *Dryodora* and other *Euplokamis*. Future work could involve searching genomes and transcriptomes for more colloblast-associated genes (e.g., Babonis et al. 2018), potentially unlocking a novel class of adhesive proteins. Many species of ctenophores are still undescribed, and it is important to document these differences among species to better understand the “hidden biology” (Dunn et al. 2015) of nonbilaterians as a whole. Observations of ctenophore colloblasts will be useful characteristics when describing new species of ctenophores. These morphometric analyses are being analyzed alongside genetic analyses to provide a more thorough understanding of the functional diversity of ctenophores.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Dimensions of Biodiversity program at the US National Science Foundation (DEB-1542679 [Haddock], DEB-1542673 [Thuesen]), the David and Lucile Packard Foundation, and the M.J. Murdock Charitable Trust. Many thanks to the blue-water divers, ROV pilots, and scientists on the R/V *Western Flyer* and the R/V *Kilo Moana* who collected ctenophores. We thank Lynne Christianson, Shannon Johnson, Darrin Schultz, Jacob Winnikoff, Tiffany Bachtel, Telissa Wilson, and Trisha Towanda for their help to make this research possible. We

un factor de los patrones geométricos presentes durante la morfogénesis epitelial de los metazoos (Gibson et al. 2006).

El contenido de los gránulos externos de secreción se desconoce. La mayoría de los autores sostienen que estos gránulos contienen un adhesivo; sin embargo, en el presente estudio no se observó material alguno cuando estos gránulos se abrieron. El copépodo observado se encontraba claramente enredado con los filamentos espiralados, lo que indica que desempeñan un papel importante en la captura de presas. No se encontraron indicios de material adhesivo en el copépodo en sí, ni en los filamentos, ni en la superficie de la coloesfera. Los estudios sobre los tentáculos de ctenóforos han sugerido que el adhesivo del coloblasto contiene un compuesto catecólico similar a DOPA (Townsend y Sweeney 2019), y los estudios moleculares indican que el adhesivo del coloblasto se encuentra exclusivamente en el filo Ctenophora (Babonis et al. 2018).

## Coloblastos de Lobata en etapa madura

Los ctenóforos del orden Lobata tienen tentáculos en la etapa larvaria, y estos tentáculos poseen coloblastos (Borisenko y Ereskovsky 2013). Poco se sabe acerca de la senescencia de los coloblastos en los tentáculos de alimentación durante la transición del estado larvario a la madurez, cuando los tentáculos de alimentación alargados son sucedidos por una franja de tentáculos orales. Las micrografías (Figs. 4c, d; 6c; 7f) de los tentáculos orales encontrados en individuos maduros de *Lobate* sp. V revelaron que los coloblastos están presentes a pesar de la pérdida de los tradicionales tentáculos para la captura de presas. La ausencia de filamentos espiralados en los coloblastos de las tentillas orales en esta especie implica que los filamentos espiralados no son necesarios para fijar la presa durante el corto tiempo de transición desde la captura por las tentillas orales hasta la ingestión.

## Conclusiones

Si bien la mayoría de las especies de nuestro estudio poseen coloblastos esféricos con un cúmulo singular de gránulos externos de secreción que recubren la coloesfera, las diferencias en la ultraestructura de los coloblastos pueden utilizarse para examinar la diversidad funcional en el filo Ctenophora. Los ctenóforos se han especializado y diversificado para consumir una amplia variedad de presas, y existen tanto generalistas como especialistas (Haddock 2007, Choy et al. 2017). Sin embargo, nuestro conocimiento actual de las adaptaciones para capturar presas específicas se basa principalmente en la morfología y el comportamiento del organismo. El potencial de agregar información ultraestructural podría mejorar en gran medida nuestra habilidad para detectar la coevolución de las estrategias de depredación y las características de las presas. Esto es particularmente prometedor en el caso de especies que no se adhieren

thank 2 anonymous reviewers for their helpful suggestions, and Iris Thuesen, University of Buenos Aires, kindly provided the Spanish translation.

## REFERENCES

- Appeltans W, Ah Yong ST, Anderson G, Angel MV, Artois T, Bailly N, Bamber R, Barber A, Bartsch I, Berta A, et al. 2012. The magnitude of global marine species diversity. *Curr Biol*. 22(23):2189–2202.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.036>
- Babonis LS, DeBiasse MB, Francis WR, Christianson LM, Moss AG, Haddock SHD, Martindale MQ, Ryan JF. 2018. Integrating embryonic development and evolutionary history to characterize tentacle-specific cell types in a ctenophore. *Mol Biol Evol*. 35(12):2940–2956.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy171>
- Bargmann W, Jacob K, Rast A. 1972. Über tentakel und colloblasten der ctenophore *Pleurobrachia pileus*. *Z Zellforsch Mik Ana*. 123(1):121–152.  
<https://doi.org/10.1007/bf00337678>
- Benwitz G. 1978. Elektronenmikroskopische untersuchung der colloblasten-entwicklung bei der ctenophore *Pleurobrachia pileus* (Tentaculifera, Cydippea). *Zoomorphologie*. 89(3):257–278.  
<https://doi.org/10.1007/bf00993952>
- Borisenko I, Ereskovsky AV. 2013. Tentacular apparatus ultrastructure in the larva of *Bolinopsis infundibulum* (Lobata: Ctenophora). *Acta Zool*. 94(2):193–202.  
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00542.x>
- Carré C, Carré D. 1980. Les cnidocysts du ctenophore *Euchlora rubra* (Kölliker 1853). *Cah Biol Mar*. 21:221–226.
- Carré C, Carré D. 1993a. *Ctenella aurantia*, genre et espèce nouveaux de cténophore tentaculé (Ctenellidae fam. nov.) méditerranéen sans colloblastes et avec ventouses labiales. *Can J Zool*. 71: 1804–1810.
- Carré D, Carré C. 1993b. Five types of colloblast in a cydippid ctenophore, *Minictena luteola*: an ultrastructural study and cytological interpretation. *Philos T Roy Soc B: Bio. Sci*. 341(1298):437–448.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.1993.0126>
- Choy CA, Haddock SHD, Robison BH. 2017. Deep pelagic food web structure as revealed by *in situ* feeding observations. *Proc R Soc B*. 284: 20172116.  
<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.2116>
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Peng K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, et al. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*. 452(7188):745–749.  
<https://doi.org/10.1038/nature06614>
- Dunn CW, Leys SP, Haddock SHD. 2015. The hidden biology of sponges and ctenophores. *Trends Ecol Evol*. 30(5):282–291.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.03.003>
- Eeckhaut I, Flammang P, Bue CL, Jangoux M. 1997. Functional morphology of the tentacles and tentilla of *Coeloplana bannworthi* (Ctenophora, Platyctenida), an ectosymbiont of *Diadema setosum* (Echinodermata, Echinoida). *Zoomorphologie*. 117(3):165–174.  
<https://doi.org/10.1007/s004350050041>
- Emson RH, Whitfield PJ. 1991. Behavioural and ultrastructural studies on the sedentary platyctenean ctenophore *Vallicula multiformis*. *Hydrobiologia*. 216:27–33.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-011-3240-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3240-4_4)
- Franc JM. 1978. Organization and function of ctenophore colloblasts: an ultrastructural study. *Biol Bull*. 155(3):527–541.  
<https://doi.org/10.2307/1540788>
- al paradigma simple de lanzar una red pegajosa para atrapar crustáceos. Las dietas de las especies sin ramificaciones laterales en sus tentáculos parecen ser ya sea especializadas (narcomedusas para *Haeckelia*, larváceas para *Dryodora*) o desconocidas (*Aulacoctena* y algunas especies de las profundidades de la zona báltica). El género *Aulacoctena* posee coloblastos que se destacan por su coloesfera elipsoide y su patrón de gránulos externos de secreción en forma de icosaedro truncado. A pesar de carecer de tentillas, los tentáculos de las especies dentro del género *Aulacoctena* son particularmente pegajosos (observaciones personales). Aunque se haya analizado una gran diversidad de ctenóforos, aún sería de gran interés examinar *Dryodora* y otros *Euplokamis*. Un futuro estudio podría involucrar la búsqueda de genomas y transcriptomas de más genes asociados a coloblastos (e.g., Babonis et al. 2018), lo que podría llevar a encontrar una nueva clase de proteínas adhesivas. Hay muchas especies de ctenóforos aún no descritas, por lo que resulta importante documentar las diferencias entre especies para comprender mejor la “biología oculta” (Dunn et al. 2015) de los no bilaterales como un todo. Las observaciones de los coloblastos en ctenóforos serán útiles al describir nuevas especies de ctenóforos. Estos análisis morfométricos se están analizando junto a los análisis genéticos para facilitar una comprensión más profunda de la diversidad funcional de los ctenóforos.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por el programa Dimensions of Biodiversity (Las Dimensiones de la Biodiversidad) de la Fundación Nacional de Ciencias de Estados Unidos (DEB-1542679 [Haddock], DEB-1542673 [Thuesen]), la David and Lucile Packard Foundation (Fundación de David y Lucile Packard) y la M.J. Murdock Charitable Trust (Fundación Benéfica de M.J. Murdock). Muchas gracias a los buzos científicos, los pilotos de vehículos operados remotamente, y los científicos a bordo del B/I *Western Flyer* y el B/I *Kilo Moana* que recolectaron ctenóforos. Damos las gracias a Lynne Christianson, Shannon Johnson, Darrin Schultz, Jacob Winnikoff, Tiffany Bachtel, Telissa Wilson y Trisha Towanda por su ayuda para hacer posible esta investigación. Agradecemos a 2 lectores anónimos por sus útiles sugerencias y a Iris Thuesen, de la Universidad de Buenos Aires, quien realizó la traducción al español.

Gibson MC, Patel AB, Nagpal R, Perrimon N. 2006. The emergence of geometric order in proliferating metazoan epithelia. *Nature*. 442:1038–1041.

Haddock SHD. 2007. Comparative feeding behavior of planktonic ctenophores. *Integr Comp Biol*. 47(6):847–853.  
<https://doi.org/10.1093/icb/pcm088>

Haddock SHD, Christianson LM, Francis WR, Martini S, Dunn CW, Pugh PR, Mills CE, Osborn KJ, Seibel BA, Choy CA, et al. 2017. Insights into the biodiversity, behavior, and bioluminescence of deep-sea organisms using molecular and maritime technology. *Oceanography*. 30(4):38–47.  
<https://doi.org/10.5670/oceanog.2017.422>

- Haddock SHD, Heine JN. 2005. Scientific Blue-Water Diving. La Jolla (CA): California Sea Grant College Program. 49 p.
- Komai T. 1922. Studies on two aberrant ctenophores, *Cæloplana* and *Gastrodes*. Kyoto (Japan): Kyoto Imperial University. 102 p. + 9 plates.  
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.7006>
- Mackie GO, Mills CE, Singla CL. 1988. Structure and function of the prehensile tentilla of *Euplokamis* (Ctenophora, Cydippida). *Zoomorphology*. 107(6):319–337.  
<https://doi.org/10.1007/bf00312216>
- Matsumoto GI, Harbison GR. 1993. *In situ* observations of foraging, feeding, and escape behavior in three orders of oceanic ctenophores: Lobata, Cestida, and Beroida. *Mar Biol*. 117(2):279–287.  
<https://doi.org/10.1007/bf00345673>
- Mills CE, Miller RL. 1984. Ingestion of a medusa (*Aegina citrea*) by the nematocyst-containing ctenophore *Haeckelia rubra* (formerly *Euchlora rubra*): phylogenetic implications. *Mar Biol*. 78:215–221.  
<https://doi.org/10.1007/bf00394704>
- Robison BH. 1993. Midwater research methods with MBARI's ROV. *Mar Technol Soc J*. 26:32–39.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 9(7):671–675, PMID 22930834  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Simion P, Philippe H, Baurain D, Jager M, Richter DJ, Di Franco A, Roure B, Satoh N, Quéinnec E, Ereskovsky A, et al. 2017. A large and consistent phylogenomic dataset supports sponges as the sister group to all other animals. *Curr Biol*. 27(7):958–967.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.031>
- Storch V, Lehnert-Moritz K. 1974. Zur entwicklung der kolloblasten von *Pleurobrachia pileus* (Ctenophora). *Mar Biol*. 28(3):215–219.  
<https://doi.org/10.1007/bf00387300>
- Toda T, Suh H-L, Nemoto T. 1989. Dry fracturing: a simple technique for scanning electron microscopy of small crustaceans and its application to internal observations of copepods. *J Crustacean Biol*. 9(3):409–413.
- Townsend JP, Sweeney AM. 2019. Catecholic compounds in ctenophore colloblast and nerve net proteins suggest a structural role for DOPA-like molecules in an early-diverging animal lineage. *Biol Bull*. 236(1):55–65.  
<https://doi.org/10.1086/700695>
- von Byern J, Mills CE, Flammang P. 2010. Bonding tactics in ctenophores—morphology and function of the colloblast system. In: von Byern J, Grunwald I (eds.), *Biological Adhesive Systems*. Vienna: Springer. p. 29–40.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0286-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0286-2_3)
- Whelan NV, Kocot KM, Moroz TP, Mukherjee K, Williams P, Paulay G, Moroz LL, Halanych KM. 2017. Ctenophore relationships and their placement as the sister group to all other animals. *Nature Ecol Evol*. 1(11):1737–1746.  
<https://doi.org/10.1038/s41559-017-0331-3>

*Received February 2020,  
accepted September 2020.*