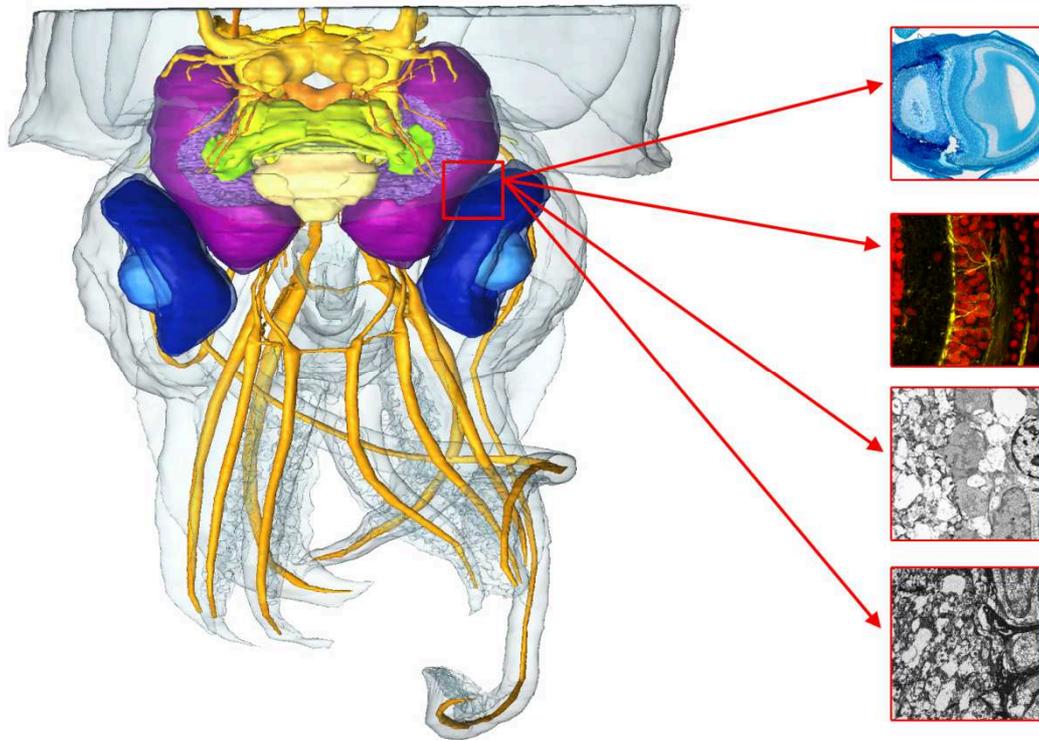


# 3D-Neuroanatomie und Feinstruktur nervöser Verschaltungen im Sehsystem von Tintenfischen (Cephalopoda)



## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie der  
**Ludwig-Maximilians-Universität**  
München



vorgelegt von  
**Elvira Wild**

München, 22.08.2013

---

Erstgutachter: PD Dr. Martin Heß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland Melzer

Eingereicht am: 22.08.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2013



## INHALT

---

<b>Inhalt</b> .....	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>Summary</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Funktionelle Morphologie von ZNS und Sehsystem bei Cephalopoden .....	10
1.1.1 Nervensystem.....	10
1.1.2 Sehsystem.....	11
1.1.3 Anpassung des Sehsystems an die Lebensweise.....	14
1.2 Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 Material .....	17
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Fixierung .....	20
2.2.2 Präparation .....	21
2.2.3 Einbettung .....	24
2.2.4 Schneiden und Färben.....	24
2.2.5 Mikroskopie .....	26
2.2.6 FIB-FESEM.....	30
2.2.7 Digitale Bildbearbeitung.....	32
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
3.1 Vergleichende 3D-Mikroanatomie und Histologie des Auges und des zentralen Nervensystems bei Schlüpflingen coleoider Cephalopoden .....	36
3.1.1 Histologie und Mikroanatomie (allgemein).....	36
3.1.2 <i>Sepia officinalis</i> .....	44
3.1.3 <i>Rossia macrosoma</i> .....	54
3.1.4 <i>Sepietta obscura</i> .....	60
3.1.5 <i>Idiosepius notoides</i> .....	64
3.1.6 <i>Loligo vulgaris</i> .....	68
3.1.7 <i>Octopus vulgaris</i> .....	72
3.1.8 Morphometrie .....	75
3.2 Retinotopie / Chiasma opticum.....	79

---

3.2.1 Semidünnschnittserien.....	79
3.2.2 Fluoreszenzversuche .....	84
3.3 Feinstruktur der plexiformen Schicht in 3D .....	92
3.3.1 serial sectioning TEM (ssTEM).....	92
3.3.2 FIB-FESEM.....	98
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>101</b>
4.1 3D-Mikroanatomie und Volumetrie des ZNS der Schlüpflinge von sechs Cephalopodenarten.....	101
4.1.1 Allgemeines .....	101
4.1.2 Vergleichende Histologie und Mikroanatomie.....	102
4.1.3 Vergleichende Volumetrie .....	108
4.1.4 Struktur und Lebensweise.....	117
4.2 Retinotopie und optisches Chiasma .....	122
4.2.1 Histologische Verfolgung der Photorezeptoraxone im Chiasma.....	123
4.2.2 Optimierung von Fluoreszenz-Mehrfachfärbungen.....	125
4.3 3D-Feinstruktur der äußeren plexiformen Schicht.....	127
4.3.1 ssTEM .....	127
4.3.2 FIB.....	130
4.4 Ausblick.....	132
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>134</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>151</b>
6.1 Chronologische Tabelle zur Augen und Hirnforschung an Cephalopoden.....	151
6.2 Abbildungsverzeichnis .....	161
6.3 Tabellenverzeichnis.....	162
<b>Dank.....</b>	<b>163</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>164</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Die adaptive Radiation einer Tiergruppe ist die evolutionäre Anpassung von Morphologie, Physiologie und Verhalten bei der Erschließung von neuen Habitaten und Ressourcen. Ein eindrucksvolles Beispiel für diesen Prozess und die reziproke Wechselbeziehung von Form und Funktion wird bei der Eidonomie und Anatomie des Sehsystems und des zentralen Nervensystems der Cephalopoden gefunden. Wir haben die Histologie und Mikroanatomie der Augen und der Gehirnneuropile von frühen Schlüpfstadien von sechs Arten der coleoiden Cephalopoden (*Sepia officinalis*, *Rossia macrosoma*, *Sepietta obscura*, *Idiosepius notoides*, *Loligo vulgaris* und *Octopus vulgaris*) untersucht, die unterschiedliche Größen aufweisen und verschiedene ethoökologische Nischen bewohnen. Basierend auf transversalen Semidünnschnittserien durch die Kopfregion und digitale Bildgebung wurden umfangreiche 3D-Strukturdatensätze in lichtmikroskopischer Auflösung erstellt. Dabei werden die histologischen Bilddaten der Kopfregion für *I. notoides*, *R. macrosoma* und *S. obscura* zum ersten Mal präsentiert. Das Segmentieren der verschiedenen Nerven und Gehirnbereiche gefolgt von Oberflächenberechnung führt schließlich zu interaktiv manipulierbaren 3D-Modellen der Neuropile, die es ermöglichen alle Komponenten in frei wählbaren Perspektiven und Kombinationen darzustellen, und zu einer vergleichenden Volumetrie der homologen Lobenneuropile. Während sie sich in der absoluten Größe beträchtlich unterscheiden, folgen das Sehsystem und das zentrale Nervensystem der sechs Arten demselben Bauplan in bereits adultähnlicher Konfiguration. Die Gestalt der verschiedenen Komponenten weist im Artenvergleich einige Plastizität auf und die Unterschiede der volumetrischen Verhältnisse werden im Hinblick auf ihre funktionelle Relevanz diskutiert. Artspezifische Unterschiede der relativen Volumina der supra- und suboesophagealen Loben werden bezogen auf unterschiedliche Ansprüche der Lebensweise (z.B. pelagisch, benthisch) an die Arm- und Schwimmmotorik, die Tarnung, sowie die sensorischen und kognitiven Fähigkeiten interpretiert. Des Weiteren wurden histologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Schlüpflingen von *Sepia officinalis* angestellt, um den Verlauf der Nervenbahnen von der Retina zum optischen Lobus zu verfolgen und das optische Chiasma im Detail zu verstehen. Anhand von Semidünnschnittserien durch das Auge und den angrenzenden optischen Lobus wurden die optischen Nerven dreidimensional dargestellt, aber ihr Austrittspunkt aus der Retina konnte nicht aufgelöst werden. Mittels Neurotracingversuchen

mit den lipophilen Carbocyaninfarbstoffen DiI, DiO und DiA wurden die Photorezeptoraxone und ihre dazugehörigen Terminalen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Die genaue Verschaltungslogik der Photorezeptoren konnte aber nicht ermittelt werden, da die Axone nicht ihren Photorezeptoren zugeordnet werden konnten. Um die Verschaltung der Photorezeptoren ultrastrukturell zu untersuchen, wurde eine lückenlose Ultradünnschnittserie von 137 Schnitten am Übergang der äußeren Körnerschicht zur äußeren plexiformen Schicht und eine FIB-Bildserie mit Hilfe der Auriga®-CrossBeam® Workstation angefertigt und Oberflächenmodelle der Photorezeptorterminalen erstellt. Dabei mündeten nebeneinander verlaufende Axone am distalen Rand der äußeren plexiformen Schicht auch in nebeneinander liegende Photorezeptorterminalen, was auf eine Regelmäßigkeit in der Verschaltung (hier: Retinotopie) der Photorezeptoren hindeutet.

## SUMMARY

---

Adaptive radiation of an animal group is the evolutionary adjustment of morphology, physiology and behavior in opening up new habitats and resources. An impressive example of this process and of the reciprocal interdependence of form and function is found in the eidonomy and anatomy of cephalopod visual and central nervous systems. We investigated the histology and microanatomy of the eyes and brain neuropiles of early post-hatching stages of six coleoid cephalopod species (*Sepia officinalis*, *Rossia macrosoma*, *Sepietta obscura*, *Idiosepius notoides*, *Loligo vulgaris*, *Octopus vulgaris*), showing different size and inhabiting different ethoecological niches. Based on transversal semithin section series through the head region and digital imaging, comprehensive 3D structure data sets were produced in light microscopic resolution. Histological image data of the head region are presented for *I. notoides*, *R. macrosoma* and *S. obscura* for the first time. The segmentation of various nerves and brain compartments followed by surface rendering finally leads on to interactively manipulable 3D-models of the neuropils enabling the display of all components in arbitrary perspectives and combinations, and to comparative volumetry of homologous lobe neuropiles. Differing in absolute size considerably, the visual and central nervous systems of the six species follow the same bauplan in adult-like configuration. The shape of various components shows some plasticity when comparing species, and differences in volumetric ratios are discussed in terms of their functional relevance. Species-specific differences in the relative volumes of supra- and subesophageal lobes are interpreted relating to different needs of the life-style (e.g. pelagic, benthic) on the brachial- and swimming motoric, camouflage, as well as sensoric and cognitive abilities. Furthermore histological and fluorescence-microscopic investigations of hatchlings of *Sepia officinalis* were performed, in order to follow the course of nerves from retina to optic lobe and to understand the optic chiasm in detail. By means of semithin section series through the eye and the adjacent optic lobe the optic nerves are displayed three-dimensionally, but their exit from the retina could not be resolved. By neurotracing experiments with the lipophilic carbocyanine dyes DiI, DiO and DiA the photoreceptoraxons and their associated terminals could be visualized fluorescence-microscopically. However the precise circuitry logic of the photoreceptors could not be determined, since the axons could not be related to their photoreceptors. In order to investigate the photoreceptor circuitry ultrastructurally a

complete ultrathin section series of 137 sections of the transition from outer granular layer to outer plexiform layer and a FIB image series by means of the Auriga®-CrossBeam® Workstation were produced and surface models of the photoreceptor terminals created. Parallel running axons end at the distal end of the outer plexiform layer also in neighboring photoreceptor terminals, which suggests a regularity in the photoreceptor circuitry, i.e. retinotopy.

## **1. EINLEITUNG**

---

### **1.1 Funktionelle Morphologie von ZNS und Sehsystem bei Cephalopoden**

Seit der Cuvier-Geoffroy-Debatte („Pariser Akademiestreit“) 1830 ist die intrinsische wechselseitige Bedingtheit von Struktur und Funktion als ein grundlegendes Prinzip der Biologie akzeptiert (siehe z.B. Lauder 1981; Boletzky 1997), das nicht zuletzt die Erforschung der funktionellen Morphologie von Sehsystemen rechtfertigt (z.B. Lythgoe 1979; Archer et al. 1999). Deshalb können auch und gerade aus morphologischer Perspektive stichhaltige Konzepte über die funktionellen Aspekte des Sehsystems sowie des peripheren und zentralen Nervensystems gefunden werden.

Cephalopoden sind eine sehr spezialisierte und hochentwickelte Gruppe innerhalb der Mollusca (Hanlon und Messenger 1996) und besitzen einen großen Verhaltensspielraum, der mit Einschränkungen an den der Vertebraten, v.a. der Fische, heranreicht (Packard 1972). Das Verhalten ist dabei auf die von den Sinnesorganen (Photo-, Chemo-, Mechanorezeptoren) gesammelten Informationen und deren Verarbeitung im Nervensystem angewiesen (Hanlon und Messenger 1996). Das Zentralnervensystem der Cephalopoden ist besonders komplex und auch das größte aller Invertebraten (Budelmann 1995). Mit der hier erfolgenden Steuerung der komplexen Motorik von Tentakelapparat, Trichter, Kiefer, Flossen und Hautpigmentierung stellt das Gehirn der Cephalopoden somit die strukturelle Grundlage eines vielschichtigen Jagd- und Sozialverhaltens dar. Als visuell orientierte Räuber (Messenger 1968) treten unter den Sinnesorganen v.a. die Augen hervor, die mit den konvergent entwickelten Linsenaugen der Vertebraten konkurrieren können (Packard 1972), aber einige spezifische strukturelle und physiologische Eigenheiten aufweisen. Deswegen wurden für die vorliegende Arbeit das zentrale Nervensystem und das Sehsystem als Thema gewählt.

#### **1.1.1 Nervensystem**

Zum Nervensystem der Cephalopoden gibt es zahlreiche morphologische Studien (siehe Kap. 6 Anhang, Tabelle 14). Bereits 1878 schuf Dietl eine Nomenklatur für die verschiedenen Loben, die bis heute mit kleineren Abänderungen Bestand hat. Anfang des 20. Jahrhunderts wurden dann ausführliche Beschreibungen des Gehirns von *Sepia officinalis* (Hillig 1912) und

verschiedenen Teuthiden (Richter 1913; Schkaff 1914) angefertigt. Ab den 60er Jahren wurden schließlich durch bessere Technik noch genauere Untersuchungen möglich. Vorreiter war hier J.Z. Young, der selbst zahlreiche morphologische Beschreibungen v.a. zu *Octopus* und *Loligo* veröffentlicht hat (1965b, 1965c, 1971, 1974, 1976b, 1977, 1979). Die Versuche, das Nervensystem in Skizzen dreidimensional darzustellen und die Verbindungen der Loben untereinander anhand einzelner histologischer Schnittbilder aufzuzeigen, erweist sich aus heutiger Sicht jedoch als suboptimal und kann mit moderner (Computer)Technik heutzutage leichter und präziser bewerkstelligt werden.

Zugleich gab es auch vergleichende Studien, die das zentrale Nervensystem morphometrisch zu erfassen versuchten und auch die Volumina der Hirnloben mit den artspezifischen Habitaten und Lebensweisen korrelierten: Angeregt durch die Arbeit von Wirz (1954, 1959) an adulten Tieren, untersuchte Frösch (1971) die Gehirne der Schlüpflinge von zehn Cephalopodenarten des Mittelmeeres mittels der Punktzählmethode und verglich die Volumenanteile der Hirnloben bei den verschiedenen Arten miteinander. Maddock und Young (1987) schließlich weiteten das Artenspektrum auf 63 Arten aus, von denen sie wiederum die adulten Tiere volumetrisch untersuchten und die Ausmaße der Loben angaben.

### **1.1.2 Sehsystem**

Die Linsenaugen der coleoiden Cephalopoden haben sich konvergent zu denen der Vertebraten entwickelt (Packard 1972; Land 1984; Sivak 2004). Dabei zeigen die ektodermalen Photorezeptoren der Cephalopoden im Gegensatz zu denen der Vertebraten zum Licht („everted“ Retina), und die erste synaptische Verschaltung findet erst in den optischen Loben und nicht (wie bei den Wirbeltieren) bereits in der Retina statt. Deshalb wird der Cortex der optischen Loben auch „retina profunda“ (tiefe Netzhaut) genannt (Young 1974). Auf dem Weg zum optischen Lobus erfahren die optischen Nervenfasern eine Kreuzung in der dorso-ventralen Ebene, d.h. die Axone der dorsalen Photorezeptoren ziehen in den ventralen Bereich des optischen Lobus und anders herum (Kopsch 1899; Stanier und Young 1955; Young 1962b, 1971). Der genaue Verlauf der Axone im optischen Chiasma ist an den bisher publizierten Skizzen (Young 1962b, 1971; Saidel 1979; Williamson et al. 1993) nur schwer nachzuvollziehen, auch wenn Young (1971) versucht die Verdrehung der einzelnen Nervenfasern und ihre Abspaltung vom Nervenbündel darzustellen (ibid. Fig. 16.24, 16.25).

Durch das Chiasma wird das durch die Linse invertierte retinale Bild im Lobus (zumindest vertikal) reinvertiert, so dass die topographische Karte der Retina im optischen Lobus erhalten bleibt (Retinotopie; siehe Young 1962b; Saidel 1979; Williamson et al. 1993). Die Terminalen der Photorezeptoraxone liegen schließlich in der äußeren plexiformen Schicht des optischen Lobus und bilden somit den ersten Verschaltungshorizont. Dieser Bereich wurde bereits eingehend elektronenmikroskopisch untersucht (Dilly et al. 1963; Case et al. 1972; Cohen 1973c), die Verschaltungsgeometrie und anzunehmende Zelltyp-Selektivitäten konnten aber anhand von Einzelschnitten nicht gezeigt werden.

Die Augengröße, Photorezeptorlänge und Photorezeptordichte haben allgemein sowohl auf die Sehschärfe wie auch die Empfindlichkeit Auswirkungen (siehe z.B. Warrant und Locket 2004; Scharpf et al. 2008). Auch durch größere Pupillen, durch die mehr Licht gesammelt wird, und die Kopplung mehrerer Photorezeptoren (räumliche Summation) kann die Empfindlichkeit verbessert werden (Warrant 1999; Warrant und Locket 2004), wobei aber durch die Summation (Konvergenz benachbarter Photorezeptorgruppen) die räumliche Auflösung entsprechend abnimmt. Die von Warrant und Locket (2004) beschriebene Möglichkeit, dass die Photorezeptordichte in unterschiedlichen Bereichen des Auges variieren kann und somit die visuelle Umwelt widerspiegelt, wurde bei Cephalopoden durch Verhaltensversuche und histologische Untersuchungen bestätigt. So beschreibt Messenger (1968) für *Sepia officinalis* das visuell gesteuerte Jagdverhalten in Verbindung mit Augenbewegungen, die darauf hindeuten, dass bestimmte Bereiche der Retina eine besonders hohe Empfindlichkeit und/oder Sehschärfe aufweisen. Dies wird auch durch die Arbeit von Young (1962a), der bei *Octopus* einen Streifen entlang des Augenäquators fand, in dem die Photorezeptoren länger und dünner sind, gestützt. Auch Talbot und Marshall (2010a, 2010b) haben kürzlich gezeigt, dass die Retinae der von ihnen untersuchten Arten einen horizontalen Streifen mit erhöhter Photorezeptordichte aufweisen, der in seiner Lage dem potenziellen Horizont in ihrem Habitat entspricht. Die Sehschärfe der coleoiden Cephalopoden ist mit der der Vertebraten vergleichbar (Muntz und Gwyther 1988; Sweeney et al. 2007), wobei die Sehschärfe von *Vampyroteuthis infernalis* sogar der des Menschen gleichkommen dürfte (Sweeney et al. 2007). Durch die Linse mit graduelltem Brechungsindex und einer Brennweite, die ungefähr dem 2,5fachen des Radius entspricht (Matthiessens Verhältnis, siehe z.B. Muntz 1977; Sivak 1982; Land 1984; Sivak et al. 1994), können Objekte in einer Entfernung vom Unendlichen bis

zu wenigen Zentimetern scharf und fehlerarm abgebildet werden (Sivak 1982; Hanlon und Messenger 1996). Coleoide Cephalopoden gelten allgemein als farbenblind, da sie in Verhaltenstests nicht zwischen Farben, sondern nur zwischen Helligkeiten unterscheiden können (Messenger 1973, 1977). Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Rhabdome in der Retina der coleoiden Cephalopoden nur ein einziges visuelles Pigment enthalten, das bei verschiedenen Arten unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweist (Hara und Hara 1967; Hara et al. 1967; Seidou et al. 1990). Einzige bisher bekannte Ausnahme ist *Watasenia scintillans*, die durch ihre drei visuellen Pigmente und ihre 2-Etagen-Retina Wellenlängen unterscheiden kann (Matsui et al. 1988; Seidou et al. 1990; Michinomae et al. 1994).

Durch Verhaltenstests (Moody und Parriss 1960, 1961; Rowell und Wells 1961; Jander et al. 1963; Shashar und Cronin 1996) und elektrophysiologische Studien (Tasaki und Karita 1966a, b; Saidel 1980) konnte gezeigt werden, dass neben allgemein fortgeschrittenen Sehleistungen die Fähigkeit des Polarisationskontrastsehens unter den Cephalopoden weit verbreitet ist. Dadurch werden z.B. *Loligo pealei* (Shashar et al. 1998b) und *Sepia officinalis* (Shashar et al. 2000) befähigt, auch bei Schwachlichtverhältnissen transparente Beute leichter zu entdecken und zu fangen. Außerdem wird vermutet, dass über die Hautoberflächenmuster mit Hilfe des Polarisationskontrastes intraspezifische Kommunikation betrieben wird, da diese im Polarisationskanal besonders kontrastreich erscheinen (Shashar et al. 1996; Grable et al. 2002; Boal et al. 2004; Shashar et al. 2004).

Als morphologische Basis dafür dienen die orthogonal zueinander ausgerichteten Microvilli in den photorezeptiven Rhabdomen der Retina, die durch die Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden konnten (Wolken 1958; Moody und Robertson 1960; Moody und Parriss 1961; Yamamoto et al. 1965). Dabei bilden vier Rhabdomere von vier benachbarten Sehzellen ein Rhabdom, in dem die Microvilli gegenüberliegender Rhabdomere parallel zueinander und die Microvilli benachbarter Rhabdomere rechtwinklig zueinander angeordnet sind (Bernard und Wehner 1977). So kann, geeignete Verschaltungsregeln vorausgesetzt, jedes Rhabdom als Zwei-Kanal-Analysator fungieren (Moody und Parriss 1961). Es wird vermutet, dass die Verarbeitung der Information über die Polarisationssebene auf eine analoge Art und Weise erfolgt wie die der chromatischen Informationen beim Farbsehen,

wobei der Stimulus in eine Intensitätsskala umgewandelt wird (Bernard und Wehner 1977). Die Frage der zentralen Integration der Informationen, die von den orthogonal zueinander stehenden Photorezeptoren stammen, ist bisher jedoch immer noch offen (Saidel et al. 1983). Gerade in Bezug auf das Polarisationskontrastsehen wäre es interessant, die Verschaltungsgeometrie der Photorezeptorzellen eines Rhabdoms in der äußeren plexiformen Schicht zu kennen.

### **1.1.3 Anpassung des Sehsystems an die Lebensweise**

Coleoide Cephalopoden sind nahezu sofort nach dem Schlupf als visuell orientierte Räuber aktiv. Demnach spielt das Sehvermögen eine herausragende Rolle (Messenger 1968; Villanueva et al. 1996), da der verbleibende innere Eidotter innerhalb der ersten Tage aufgebraucht wird und die Schlüpflinge sofort Beute fangen müssen, um zu überleben. Dabei muss ihr Sehsystem an die jeweilige Lichtbedingungen der Umwelt und die Sichtbarkeit der Beute auf eine artspezifische Weise angepasst sein. Offensichtlich sind die Schlüpflinge voradaptiert an die speziellen Anforderungen ihres Habitats, eine Tatsache, die sich unter anderem in den morphologischen Unterschieden der Augen und optischen Loben der verschiedenen Arten widerspiegeln sollte. Schlüpflinge von *Sepia officinalis* zum Beispiel besitzen ziemlich große Augen mit einer hohen Sehschärfe, die sich mit dem Wachstum nur noch wenig verbessert (da die Augen langsamer wachsen als der Rest des Körpers: Groeger et al. 2005; 2006). Die Empfindlichkeit nimmt dabei mit zunehmender Größe leicht ab. Nichtsdestotrotz kommt es auch während des allometrischen Wachstums auf die Augengröße an, da die Zellzahlen eines zweidimensionalen Rezeptororgans wie der halbkugeligen Retina mit dem Quadrat des Radius ansteigen, bei den dreidimensionalen Hirnloben jedoch mit der dritten Potenz.

Eine Anpassung an Unterschiede im photischen Habitat (z.B. pelagisch vs. benthisch, Flachwasser vs. Tiefsee, siehe Tabelle 1) spiegeln sich auch in der Spektralempfindlichkeit der Photopigmente wider (Muntz und Johnson 1978). Das visuelle Pigment der Oegopsida, die in großen Tiefen vorkommen, weist ein Absorptionsmaximum von 480 nm auf, wohingegen das Maximum vom epipelagialen *Loligo peali* bei 493 nm liegt. Die Octopoden als Flachwasserbewohner weisen aber bei noch kürzeren Wellenlängen (470 – 477 nm) ihr

Maximum auf als die Oegopsida. Deswegen sehen Muntz und Johnson (1978) bei den Cephalopoden eine stärkere Korrelation der spektralen Eigenschaften der visuellen Pigmente mit der Phylogenie als mit den Lichtgegebenheiten. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass blauempfindliche Photorezeptoren besonders gut für ein Polarisationskontrastsehen geeignet sind, da die streuungsbedingte Polarisation des Hintergrundlichtes unter Wasser bei kurzen Wellenlängen besonders markant ist (M. Heß, persönliche Mitteilung).

**Tabelle 1: Lebensweise der untersuchten Arten.**

Art	Lebensweise Schlüpfling	Lebensweise Adultus
<i>Sepia officinalis</i>	Schlüpft adult-ähnlich, benthopelagisch (Nixon und Mangold 1998)	Benthisch, demers, neritisch (Jereb und Roper 2005)
<i>Rossia macrosoma</i>	Schlüpft adult-ähnlich (Boletzky und Boletzky 1973), benthisch (Boletzky 2003)	Benthisch, demers (Jereb und Roper 2005)
<i>Sepietta obscura</i>	Benthisch (Boletzky et al. 1971; Boletzky 2003)	Benthisch mit vertikalen Migrationen (Jereb und Roper 2005)
<i>Idiosepius notoides</i>	Planktonisch (Boletzky 2003; Yamamoto et al. 2003)	Nero-benthisch (Boletzky 2003; Yamamoto et al. 2003)
<i>Loligo vulgaris</i>	Planktonisch (Boletzky 1974; Jereb und Roper 2010)	Neritisch mit vertikalen Migrationen, semi-pelagisch (Roper et al. 1984; Jereb und Roper 2010)
<i>Octopus vulgaris</i>	Planktonisch, (33 – 54 Tage) (Nixon und Mangold 1998)	Benthisch, neritisch (Roper et al. 1984)

## 1.2 Zielsetzung der Arbeit

Da selbst durch gut ausgewählte histologische Schnittebenen (in 2D) nur ein skizzenhaftes Gesamtbild der 3D-Strukturen des ZNS der Cephalopoden erzielt werden kann, wird in dieser Arbeit eine komplettere Beschreibung und eine leichter nachvollziehbare Darstellung durch moderne Methoden der computergestützten 3D-Bildgebung auf der Basis von Schnittserien und digitalen 3D-Oberflächenmodellen angestrebt. Durch die manuelle Segmentierung wird zusätzlich eine präzise 3D-Morphometrie ermöglicht (z.B. Volumetrie, Strecken- und Winkelmessungen im Raum). In der vorliegenden Arbeit sollen die 3D-Mikroanatomie und die Histologie der Augen und des zentralen Nervensystems der Schlüpflinge von sechs Arten der coleoiden Cephalopoden aus verschiedenen Familien und mit unterschiedlicher Größe, Habitat und Verhalten untersucht werden. So wird die Datengrundlage für die strukturelle Beschreibung und den interspezifischen Vergleich, bei dem eine funktionelle und adaptive

Deutung vorgenommen wird, und für weiterführende Untersuchungen am Sehsystem geliefert. Dabei sollen die interspezifischen Strukturunterschiede, die auch zu funktionellen Unterschieden führen, als Anpassungen an die unterschiedlichen Anforderungen an das Sehsystem in unterschiedlichen Habitaten und bei unterschiedlichem visuell gesteuertem Verhalten nach dem Schlupf erklärt werden.

Anhand von verschiedenen Schnitttechniken (Semi-, Ultradünn- und Vibratomschnitte), Färbemethoden (klassisch histologisch und Fluoreszenzmarkierung) und mikroskopischen Verfahren (Licht-, Laserscanning- und Elektronenmikroskopie) soll schließlich das Sehsystem und hier im Speziellen die Photorezeptoren von der Retina bis zum optischen Lobus untersucht werden. Dabei liegt das Augenmerk auf der Entwirrung des optischen Chiasmas und der Verfolgung der Photorezeptoraxone durch dieses bis zu ihrem Terminationshorizont in der äußeren plexiformen Schicht des optischen Lobus. Es soll zugleich die Retinotopie als topographische Abbildung der Retina im optischen Lobus nachvollzogen werden. Aufgrund der verfügbaren elektronenmikroskopischen Möglichkeiten (ssTEM, FIB-FESEM) soll außerdem eine dreidimensionale Feinstrukturuntersuchung des ersten Verschaltungshorizonts in der äußeren plexiformen Schicht durchgeführt werden. Dabei soll die Verschaltungsgeometrie der Photorezeptorterminalen zueinander bzw. untereinander und mit den Sekundärneuronen dargestellt werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1 Material

Zur Untersuchung der 3D-Neuroanatomie und Feinstruktur nervöser Verschaltungen im Sehsystem wurden die Schlüpflinge von sechs Arten der coleoiden Cephalopoden verwendet. Schlüpflinge eignen sich für die angewandten Methoden besonders gut, da sie noch viel kleiner als die Adulti sind, aber trotzdem über ein weit entwickeltes Nervensystem und ein bereits funktionierendes Sehsystem verfügen. Es wurden fünf Vertreter der Decapodiformes (*Sepia officinalis*, *Rossia macrosoma*, *Sepietta obscura*, *Idiosepius notoides* und *Loligo vulgaris*) und ein Vertreter der Octopodiformes (*Octopus vulgaris*) untersucht. Die Schlüpflinge wurden je nach Verfügbarkeit für die verschiedenen Methoden verwendet (siehe Tabelle 2).

#### ***Sepia officinalis***

Die Schlüpflinge von *S. officinalis* stammen aus Eiern, die im August 2008 und 2010 in der Bucht von Barbariga nahe Rovinj (Nordadria, Kroatien) und im Juli 2011 nahe Roscoff (Atlantik, Frankreich) gesammelt wurden (Abb. 1B+E). Die Eier wurden bis zum Schlupf in einem Aquarium gehalten.

#### ***Rossia macrosoma* und *Sepietta obscura***

Die Schlüpflinge von *R. macrosoma* und *S. obscura* stammen aus Zuchtexperimenten an der Meeresstation Banyuls (Dr. Sigurd von Boletzky, Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, Frankreich, Abb. 1D-F). Von ihnen standen vorgefertigte, gefärbte Paraffin-Schnittserien auf Glasobjektträgern zur Verfügung, die uns zur Digitalisierung und späterer Bearbeitung überlassen wurden. Die Präparate waren „routinemäßig abwechselnd mit „Azan“ (Azocarmin + Anilinblau + Orange G) und „Trichrome de Masson“ (Eisen-Hämatoxilin + Fuchsin + Phosphorwolframsäure + Ponceau-Rot + Lichtgrün) gefärbt“ (Dr. Sigurd von Boletzky, pers. Mitteilung).

#### ***Idiosepius notoides***

Adulti von *I. notoides* wurden von Tim Wollesen in der Moreton Bay (Pazifik, Queensland, Australien, Abb. 1G+H) gesammelt und zur Reproduktion in Aquarien gehalten (Wollesen et

al. 2009, 2010b). Die uns zur Verfügung gestellten Schlüpflinge wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Paraformaldehyd bzw. Glutaraldehyd fixiert und in Phosphatpuffer mit Natriumazid gelagert.

### ***Loligo vulgaris***

*L. vulgaris* kommt aus dem Aquarium in Roscoff (Frankreich, Abb. 1A+E), wo Laichschnüre aus dem nahegelegenen Atlantik bis zum Schlupf in Aquarien gehältert wurden.

### ***Octopus vulgaris***

Der Schlüpfling von *O. vulgaris* lag als vorgefertigte, Azan-gefärbte Paraffin-Schnittserie auf Glasobjektträgern aus dem Histologie-Kursbestand der Universität Wien vor und wurde uns zur Digitalisierung überlassen (Abb. 1C+E).

## **Systematische Klassifizierung der untersuchten Arten (nach Young et al. 2012)**

Unterklasse: Coleoidea

Überordnung: Decapodiformes

Ordnung: Sepioidea

Familie: Sepiidae (***Sepia officinalis* Linnaeus, 1758**)

Familie: Sepiolidae

Unterfamilie: Rossiinae (***Rossia macrosoma* (Delle Chiaje, 1829)**)

Unterfamilie: Sepiolinae (***Sepietta obscura* Naef, 1916**)

Ordnung: unsicher

Familie: Idiosepiidae (***Idiosepius notoides* Berry, 1921**)

Ordnung: Teuthoidea

Unterordnung: Myopsida

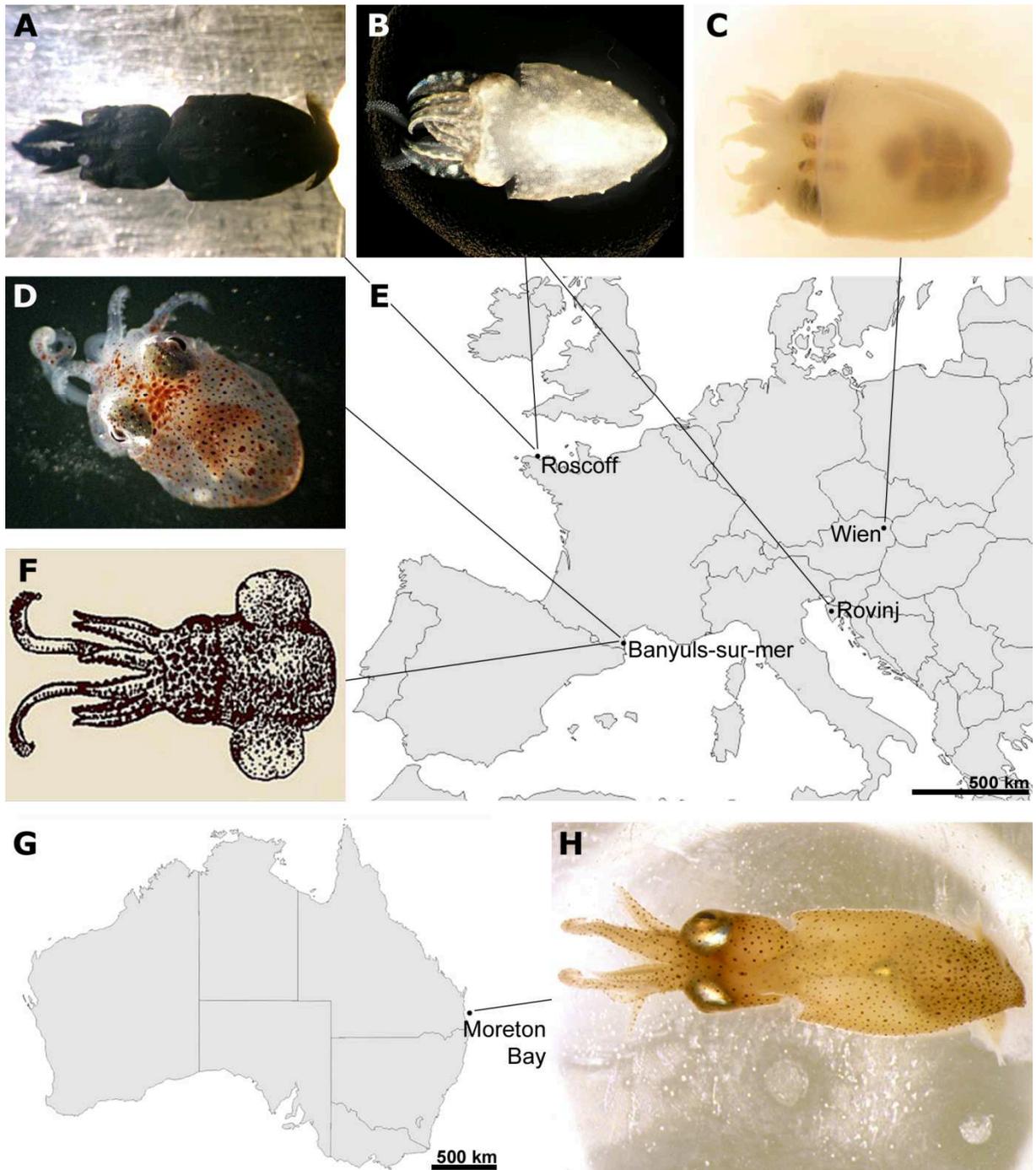
Familie: Loliginidae (***Loligo vulgaris* Lamarck, 1798**)

Überordnung: Octopodiformes

Ordnung: Octopoda

Unterordnung: Incirrata

Familie: Octopodidae (***Octopus vulgaris* Cuvier, 1797**)



**Abbildung 1: Verwendete Tiere und Karten zur Herkunft.**

- A:** *Loligo vulgaris*: osmierter Schlüpfling eingebettet in Epon.  
**B:** *Sepia officinalis*: relaxierter Schlüpfling.  
**C:** *Octopus vulgaris*: fixierter Schlüpfling.  
**D:** *Rossia macrosoma*: Foto von Hilmar Hinz (publiziert auf der MarLIN Website).  
**E:** Europakarte mit den Fundorten bzw. Bezugsquellen der Schlüpflinge.  
**F:** *Sepietta obscura*: (<http://www.abyssoflu.com/cephalopods003sepiolidae.htm>)  
**G:** Australienkarte mit dem Fundort von *Idiosepius notoides*.  
**H:** *Idiosepius notoides*: fixierter Schlüpfling.

**Tabelle 2: Übersicht über die untersuchte Arten und die verwendeten Methoden.**

Art	LM	3D-Rekonstruktion	Fluoreszenz / CLSM	TEM	FIB
<i>Sepia officinalis</i>	x	x	x	x	x
<i>Rossia macrosoma</i>	x	x			
<i>Sepietta obscura</i>	x	x			
<i>Idiosepius notoides</i>	x	x			
<i>Loligo vulgaris</i>	x	x			
<i>Octopus vulgaris</i>	x	x			

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Fixierung

Für die verschiedenen angewandten Methoden war es nötig, dass das vorhandene Material optimal fixiert war. Vor der Fixierung wurden die Schlüpflinge mit meerwasserisotonischer Magnesiumchloridlösung ( $MgCl_2$ ) relaxiert.

Für die **Lichtmikroskopie** wurden die Schlüpflinge für zwei Wochen entweder in 4% Formaldehyd oder 2,5% Glutaraldehyd jeweils in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) fixiert, welches dann in mehreren Spülgängen mit Phosphatpuffer ausgewaschen wurde. Vor der Einbettung in Kunstharz (Epon) erfolgte dann noch eine Postfixierung in 1%iger Osmiumtetroxid-Lösung (2%iges  $OsO_4$  und 0,2 M Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1) auf Eis für zwei Stunden.

Für die Fixierung für die **Fluoreszenzmikroskopie** wurde 4% Formaldehyd verwendet, da Glutaraldehyd eine starke, breitbandige Eigenfluoreszenz des fixierten Gewebes verursacht.

Für die Untersuchung am **Transmissionselektronenmikroskop** wurden die Schlüpflinge für 2 Wochen in 2,5% Glutaraldehyd fixiert und bis zur Weiterbearbeitung im Kühlschrank in Phosphatpuffer mit Natriumazid aufgehoben. Vor der Einbettung in Epon wurden die fixierten Schlüpflinge zunächst für zwei Stunden auf Eis in 1%iger Osmiumtetroxid-Lösung (2%iges  $OsO_4$  und 0,2 M Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1) nachfixiert.

Für die Untersuchung am **FIB-FESEM** wurden die Schlüpflinge in 2,5% Glutaraldehyd mit 1% Tannin fixiert. Ein Stück eines optischen Lobus wurde dann osmiert (1%  $OsO_4$  in 0,1 M Cacodylatpuffer, 2 Stunden auf Eis), und anschließend für eine Stunde bei 40 °C mit 1%iger Uranylacetatlösung behandelt.

### 2.2.2 Präparation

Da für die gegebenen Fragestellungen nur der Kopfbereich der Schlüpflinge interessant ist, wurde bei den größeren Schlüpflingen der hintere Teil des Körpers mittels einer scharfen Rasierklinge entfernt und nur der vordere Teil weiterverarbeitet.

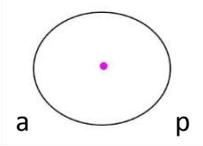
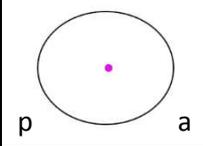
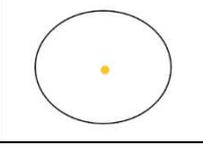
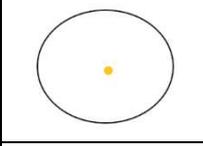
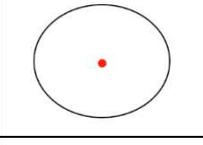
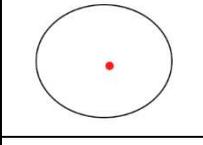
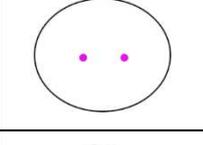
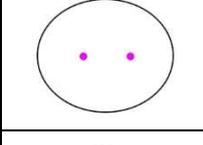
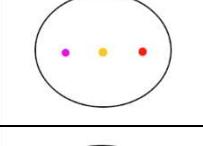
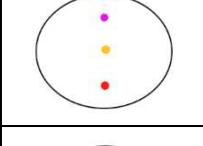
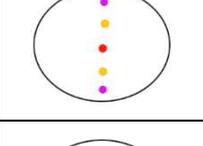
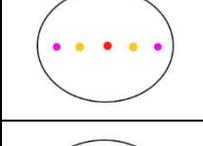
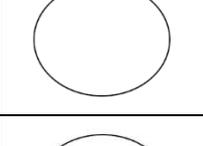
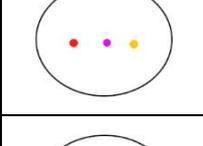
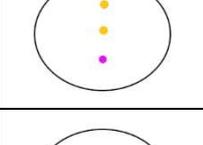
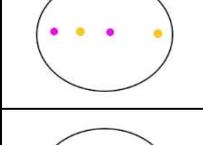
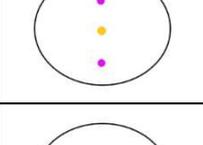
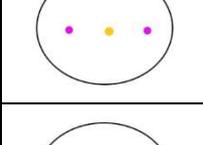
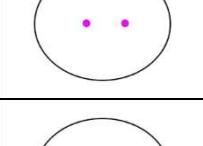
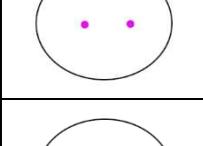
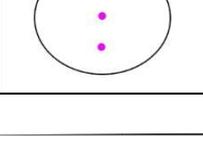
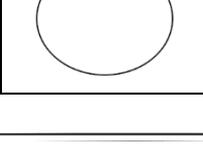
#### Neurotracing

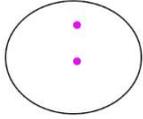
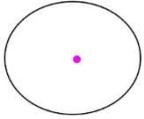
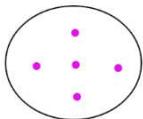
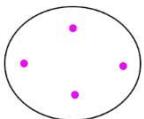
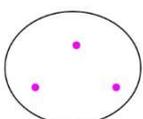
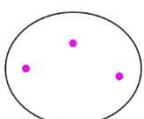
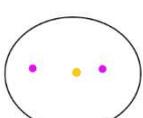
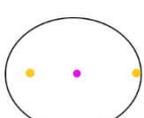
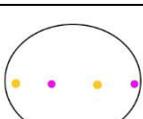
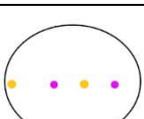
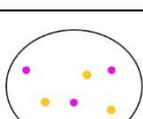
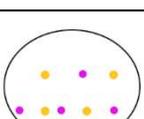
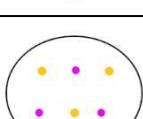
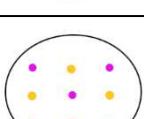
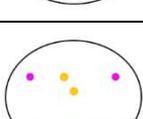
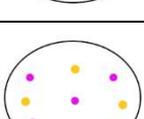
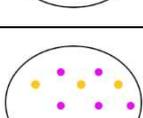
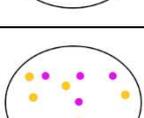
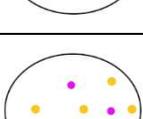
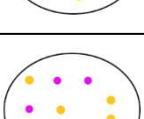
Für die Neurotracingversuche wurde bei den verwendeten Schlüpflingen mit einer scharfen Rasierklinge unter dem Stereomikroskop Cornea und Linse von den Augen abgetrennt. Anschließend wurden auf die Photorezeptoren der Retina Kristalle der lipophilen Carbocyanin-farbstoffe DiI, DiO bzw. DiA (siehe Tabelle 3) mit einer feinen Nadelspitze in unterschiedlichen Anordnungen (siehe Tabelle 4) aufgebracht. Das Auge wurde dann mittels Agar (4% Agarose in Phosphatpuffer) verschlossen. Die Präparate wurden in einer feuchten Kammer mit Phosphatpuffer mit Natriumazid aufbewahrt, die anschließend mit Parafilm verschlossen, in Alufolie eingewickelt, beschriftet und in einer dunklen Schublade bei Raumtemperatur gelagert wurde. Nach einer Laufzeit von zwei bis elf Tagen, in der sich die Carbocyanin-farbstoffe durch laterale Diffusion in den Plasmamembranen ausgebreitet hatten, wurde der Agarpfropfen entfernt und die Kristalle mit dem Wasserstrahl aus einer Wasserspritzflasche weggespült, um diffuse Fluoreszenzfärbung beim Schneiden zu vermeiden. Der Kopf des Schlüpflings wurde dann in 4% Agar eingebettet (siehe Kapitel 2.2.3).

**Tabelle 3: IUPAC-Namen und Exzitations-/ Emissionswerte der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.**

Abkürzung	IUPAC-Name (englisch)	Exzitationsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
<b>DiI</b>	1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate	549	565
<b>DiO</b>	3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate	484	501
<b>DiA</b>	4-(4-(dihexadecylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide	456	590
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindole	358	461
<b>To-Pro-3</b>	4-[3-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2(3H)-ylidene)prop-1-en-1-yl]-1-[3-(trimethylammonio)propyl]quinolinium	642	661

**Tabelle 4: Übersicht über die Vibratomschnitte und das Auflegemuster der Carbocyaninkristalle auf der Retina von *Sepia officinalis*.**

Tier	Tracer	Linkes Auge	Rechtes Auge	Laufzeit (Tage)	Schnittdicke (µm)	Kernfärbung
01	Dil			7	100	DAPI
02	DiO			7	100	---
03	DiA			7	100	---
04	Dil			2	100	To-Pro-3
05	Dil, DiO, DiA			6	80	DAPI
06	Dil, DiO, DiA			6	80	DAPI
07	Dil, DiO, DiA			6	80	DAPI
08	Dil, DiO			8	80	DAPI
09	Dil, DiO			8	80	DAPI
10	Dil			7	70	DAPI
11	Dil			7	100	---

12	Dil			7	100	---
13	Dil			6	100	---
14	Dil			6	100	---
15	Dil, DiO			6	100	---
16	Dil, DiO			6	100	---
17	Dil, DiO			6	100	---
18	Dil, DiO			11	100	---
19	Dil, DiO			11	100	---
20	Dil, DiO			9	100	---
21	Dil, DiO			9	100	---

a: anterior, p: posterior, lila: Dil, orange: DiO, rot: DiA.

### **2.2.3 Einbettung**

#### **Epon**

Da die Präparate für die Einbettung in Kunstharz völlig wasserfrei sein mussten, wurden sie zuerst über eine aufsteigende Acetonreihe entwässert. Dazu wurden sie für jeweils 20-30 Minuten in 30%, 50%, 75%, 90%, 99% und dreimal 100% Aceton gegeben. Zur Infiltration mit Epon wurden die Schlüpflinge nach der Entwässerung zuerst in ein Gemisch von 100%igem Aceton und Epon im Verhältnis 1:1 überführt und in geschlossenen Schnappdeckelgläsern für zwei Stunden rotiert. Nach Abnahme der Deckel wurden die Schnappdeckelgläser zur Verdampfung des Acetons über Nacht in einen Exsikkator gestellt, um sicher zu gehen, dass die Proben kein Wasser aus der Luft ziehen. Anschließend wurden die Präparate für vier Stunden in reines Epon überführt und schließlich in Epon mit dem Beschleuniger DPM in Silikonförmchen eingebettet. Zum Auspolymerisieren wurden die Formen für zwei Tage in den Wärmeschank bei 60 °C gestellt.

#### **Agar**

Zur Einbettung in Agar wurde zunächst 4%ige Agar aus Agarose in Phosphatpuffer angesetzt und in der Mikrowelle erwärmt bis sich die Agarose gelöst hatte. Nun wurde die Vertiefung einer 24-Mikrotiterplatte mit Agar befüllt und das Präparat aus dem Puffer in den Agar überführt. Dabei wurde es im Agar leicht hin und her bewegt, damit eine gute Verbindung zwischen Tier und Agar hergestellt werden konnte, was für ein gleichmäßiges Schneidergebnis von großer Bedeutung ist. Nach dem Festwerden des Agars konnte das eingebettete Präparat aus der Mikrotiterplatte genommen werden und das überschüssige Einbettmedium zum Trimmen mit einer Rasierklinge entfernt werden.

### **2.2.4 Schneiden und Färben**

#### **Semidünnschnitte**

Für Semidünnschnitte wurden die in Epon eingebetteten Schlüpflinge in einem Präparatehalter für Ultramikrotome eingespannt und anschließend das Blöckchen mit einer Rasierklinge so zu einer Pyramide getrimmt, dass eine möglichst kleine, trapezförmige Schnittfläche übrigblieb. An der Unterkante des Eponblocks wurde dann Pattex mit Xylol vermischt angebracht, um beim Schneiden Schnittbänder zu erhalten (nach Ruthensteiner 2008). Am

Ultramikrotom MT-7000 der Firma RMC wurden dann mit einem Diatome® Histo Jumbo Diamantmesser Semidünnschnittbänder mit einer Dicke zwischen 1,35 µm und 3 µm angefertigt (siehe Tabelle 5 Tabelle 6) und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden auf einer Wärmeplatte bei 60 °C gestreckt, bei 80 °C getrocknet und schließlich mit Methyleneblau/Azurblau nach Richardson gefärbt (Richardson et al. 1960). Zur Aufbewahrung und zur optimalen Abbildung am Lichtmikroskop wurden die Objektträger anschließend mit Deckgläsern und DPX eingedeckt.

### Vibratomschnitte

Die in Agar eingebetteten Köpfe wurden am Vibratom Leica VT 1000S mit einer Rasierklinge in Horizontalschnitte mit einer Dicke von 70 bis 100 µm zerlegt, die in Puffer aufgefangen und anschließend auf Objektträger aufgebracht wurden. Die Färbung der Zellkerne erfolgte nachträglich mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI bzw. To-Pro-3 (siehe Tabelle 3) für ca. dreißig Minuten.

**Tabelle 5: Schnittserien von der Kopfregion von Cephalopoden-Schlüpflingen.**

Art	Schnitte	Schnitt- dicke	Auflösung (Photo) µm/px	Auflösung (Reko) µm/px	Herkunft
<i>Sepia officinalis</i>	2060**	2,6 µm	5,15	5,15	Rovinj
<i>Rossia macrosoma</i>	322	7 µm*	1,43	4	Banyuls
<i>Sepietta obscura</i>	410	8,75 µm*	1,43	4	Banyuls
<i>Idiosepius notoides</i>	1080**	3 µm	2,58	2,58	Moreton Bay
<i>Loligo vulgaris</i>	1188**	2,1 µm	0,73	1,46	Roscoff
<i>Octopus vulgaris</i>	178	8,7 µm*	0,44	1,79	Wien

\* Die Schnittdicke wurde nach der 3D-Rekonstruktion auf diesen Wert korrigiert, um kugelige Linsen zu erhalten.

\*\* Hiervon wurde jeder vierte Schnitt zur Rekonstruktion verwendet.

**Tabelle 6: Semidünnschnittserien durch Auge und optischen Lobus von *Sepia officinalis*.**

Serie	Schnitte	Schnittdicke	Auflösung [µm/px]	Herkunft
Serie 1	288	1,35 µm	1,61	Rovinj
Serie 1 Detail	55	1,35 µm	0,32	Rovinj
Serie 2	557	1,5 µm	0,97	Rovinj

### **Ultradünnschnitte**

Vor der Erstellung der Ultradünnschnittserie wurden zuerst Semidünnschnitte durch den Kopf eines glutaraldehydfixierten und in Epon eingebetteten Schlüpflings von *S. officinalis* in Epon eingebettet angefertigt, um die gesuchte Region zu finden. Am Ultramikrotom Leica EM UC6 wurde dann eine Ultradünnschnittserie von 137 Schnitten am Übergang der äußeren Körnerschicht zur äußeren plexiformen Schicht mit einer mittleren Schnittdicke von 70 nm angefertigt. Die Schnitte wurden in kurzen Bändern mit Kupferlochgrids aufgefangen, die mit Formvar-Folie bespannt waren, und nach dem Trocknen in einer Gridbox aufbewahrt. Zur Betrachtung am Transmissionselektronenmikroskop erfolgte anschließend die Kontrastierung mit gesättigten Lösungen der Schwermetallsalze Uranylacetat (8%, für acht Minuten bei 37°C) und Bleicitrat (fünf Minuten bei Raumtemperatur) nach Reynolds (1963).

## **2.2.5 Mikroskopie**

### **Lichtmikroskopie (Durchlicht Weitfeld)**

Die gefärbten und auf Objektträgern eingedeckten Semidünnschnitte wurden anfangs am Lichtmikroskop Olympus CX 41 mit der Digitalkamera Olympus Camedia C-5060 über das Computerprogramm cellA (soft imaging system, Olympus) formatfüllend abfotografiert. Hierbei kamen je nach Objekt- bzw. Ausschnittsgröße folgende Objektive zum Einsatz: PlanCN 10x (NA 0,25), PlanCN 20x (NA 0,40) und UPlanSApo 40x (NA 0,95). Desweiteren wurden am Olympus dotSlide-Setup (Mikroskop Olympus BX51, Kamera Olympus XC 10 und ein PC mit dotSlide-Software) die kompletten Objektträger mit den Semidünnschnitten digitalisiert. Je nach erforderlicher Auflösung wurden folgende Objektive verwendet: UPlanSApo 10x (NA 0,40), UPlanSApo 20x (NA 0,75) und UPlanSApo 40x (NA 0,95).

### **Fluoreszenzmikroskopie**

Am Fluoreszenz-Stereomikroskop M205 FA der Firma Leica wurden die mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten Vibratomschnitte untersucht. Mit der Kamera Leica DFC340 FX, die über das Computerprogramm Leica Suite 3.3.1 bedient wurde, konnten Übersichtsbilder und gegebenenfalls Detailfotos aufgenommen werden. Dabei wurde DAPI mittels UV-Filter, DiO mittels GFP-Filter und DiI und DiA mittels m-Cherry-Filter detektiert (siehe Tabelle 7) und einzeln aufgenommen. Das Programm erstellte selbstständig Overlays der einzelnen Kanäle

zusammen mit den zusätzlich aufgenommenen Auflichtbildern. Overlaybilder wurden zudem am Computer manuell in Adobe® CreativeSuite® 5.0 erstellt, da diese durch eine bessere Auflösung detaillierte Strukturen lieferten.

**Tabelle 7: Filter des Fluoreszenzstereomikroskops und verwendete Farbstoffe.**

Filter	Anregung	Emission	verwendete Farbstoffe
UV	340 - 380 nm	420+ nm	DAPI
GFP Plants	450 - 490 nm	500 - 550 nm	DiO
m-Cherry	540 - 580 nm	600 - 610 nm	DiI, DiA

### **Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)**

Ausgewählte Schnitte wurden ferner zur umfassenderen Untersuchung und besseren optischen Darstellung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS SP5 AOBs (Acousto-Optical Beam Splitter) betrachtet. Durch die Anregung der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe durch spektral unterschiedliche Laser (siehe Tabelle 8) und die Detektion definierter Emissionsbänder mittels Photomultiplier konnten Mehrfachfärbungen besser voneinander getrennt aufgenommen werden.

Um die Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zu ermitteln, wurden Lambda-Scans durchgeführt. Dazu wurde zunächst für jeden einzelnen Farbstoff eine Bilderserie mit gleicher Ebene und Laserleistung (20%), jedoch mit schrittweise veränderten Detektionswellenlängen aufgenommen. Der Abstand der Abtastschritte betrug 5 nm und die Bandbreite, die als Maß der Überlappung diente, variierte zwischen 8 und 10 nm. Die aufgenommenen Bilderserien wurden anschließend mit dem Programm „Image J“ bearbeitet. Hier wurde die Gesamthelligkeit der einzelnen Bilder mit der Funktion „Measure Stack“ ermittelt. In Microsoft Excel wurde dann die Helligkeit gegen die Emissionswellenlänge aufgetragen und so für jeden Farbstoff die Bandbreite und das Maximum der Emissionsspektren graphisch dargestellt (Abb. 2).

Außerdem ermöglicht eine Lochblende, die im Brennpunkt der Tubuslinse (= Zwischenbildebene) angebracht ist und Fluoreszenzlicht außerhalb der Fokusebene abblockt, das „optische Schneiden“. Hierbei wurde durch schrittweise Verschiebung der Fokusebenen um

je 1,5 µm in z-Richtung ein Bilderstapel erzeugt, der die Dreidimensionalität des mechanischen Vibratormschnitts erfasst. Um das Rauschen in den Bildern zu vermindern, wurden die Bilder jeder Ebene als gemittelte Durchschnittsbilder aus vier nacheinander aufgenommenen Einzelbildern erstellt. Die Pixelgröße betrug 500 nm und die Bildgröße wurde auf 512 x 512 Pixel festgelegt.

**Tabelle 8: Übersicht der im Konfokalmikroskop befindlichen Laser.**

Lasertyp	Wellenlänge in nm
Diodenlaser	405
Argonlaser	458, 476, 488, 496, 514
Diodengepumpter Festkörperlaser	561
Helium-Neon-Laser	633

---

**Abbildung 2: Übersicht über die Emissionsspektren aller verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.**

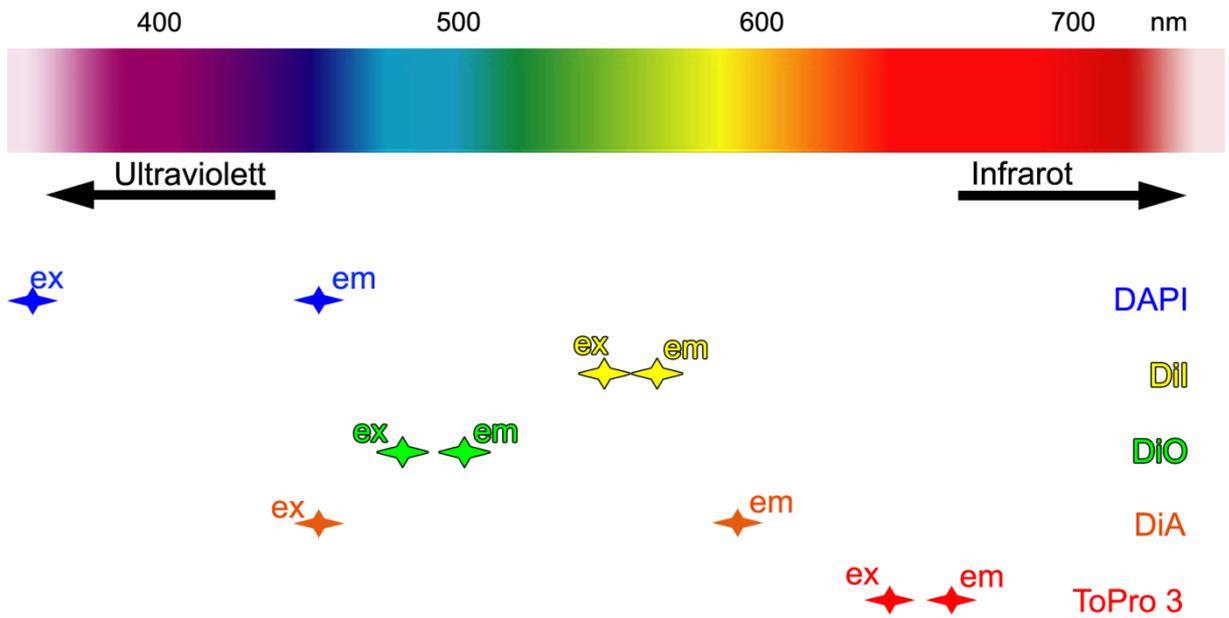
**A:** Exzitations- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

**B:** Emissionsspektren erstellt mittels Lambda-Scans an je einem mit DiI, DiA und DiO gefärbten Schnitt. Die Helligkeit ist gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die verwendeten Exzitationswellenlängen der verschiedenen Farbstoffe sind: **DiA** (rot) 488 nm; **DiI** (gelb) 514 nm; **DiI** (hellgelb) 561 nm; **DiO** (grün) 488 nm.

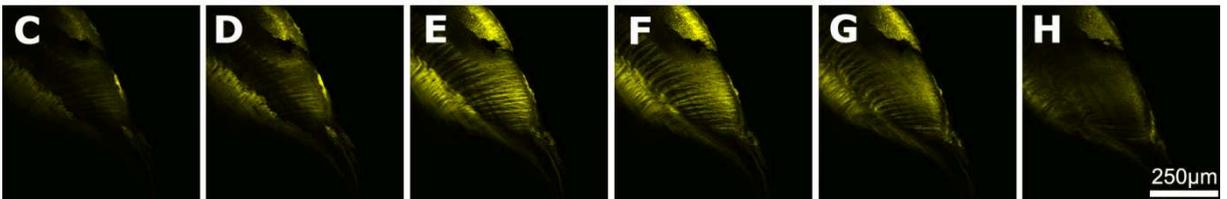
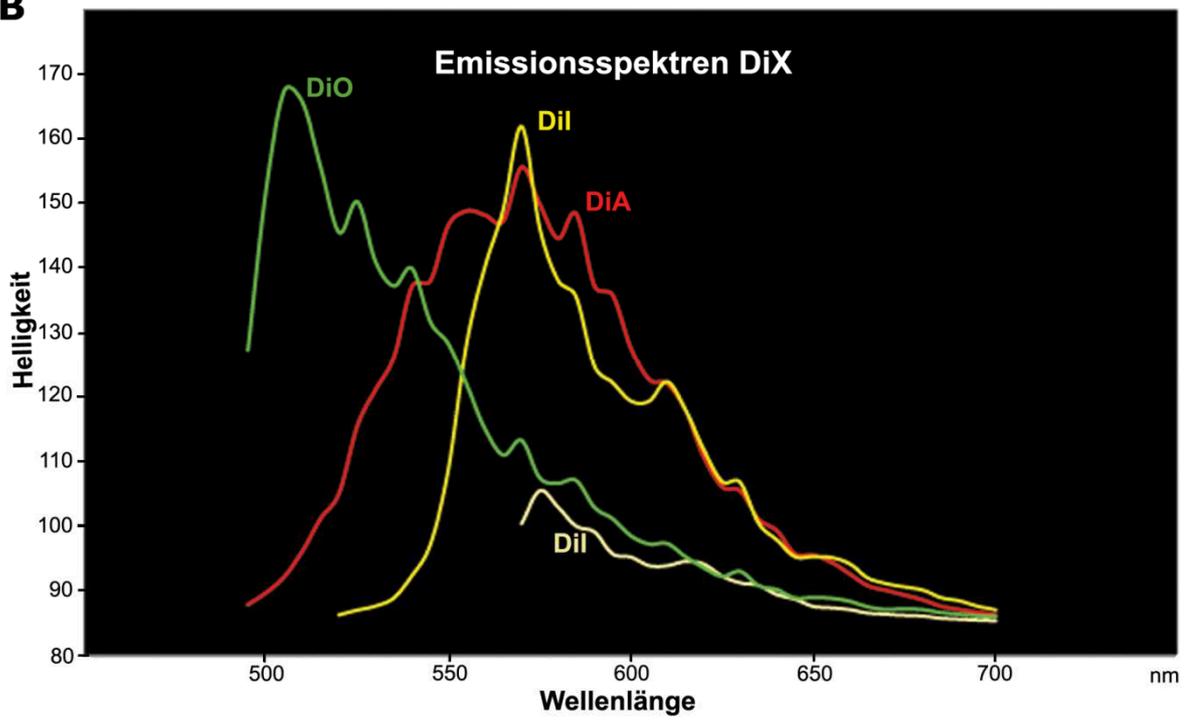
**C-H:** Schnitt auf dem das DiI mit der Exzitationswellenlänge von 514 nm angeregt wurde, mit unterschiedlichen Wellenlängen detektiert. Deutlich zeigt sich die an- und absteigende Helligkeit des Farbstoffes, wie sich oben in der Emissionskurve B (gelbe Linie) ablesen lässt.

**em**= Emission; **ex**= Exzitation

**A**



**B**



### Transmissionselektronenmikroskopie

Die kontrastierten Ultradünnschnitte wurden am Transmissionselektronenmikroskop Morgagni 268 der Firma FEI mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV untersucht. Wegen der vergleichsweise geringen Abmessung der TEM-Kamera (1,3 MPx), wurden mittels Multi Image Alignment (MIA) digitale Bilder aufgenommen, die aus 3\*3 überlappenden Einzelbildern zusammengesetzt waren. Da das automatische Zusammensetzen nicht fehlerlos erfolgte, wurden jeweils sowohl das Gesamtbild als auch die Einzelbilder abgespeichert und im Anschluss im Programm Adobe® CreativeSuite® 5.0 überprüft und eventuelle Fehler behoben.

**Tabelle 9: Vergleich der Ultradünnschnittserie vom TEM und der FIB-Serie durch den optischen Lobus zur 3D-Rekonstruktion von *Sepia officinalis*.**

Serie	N (Schnitte)	Schnittdicke	Auflösung [nm/px]	Herkunft
TEM	137	70 nm	9,8	Rovinj
FIB	989	24 nm	12	Rovinj

#### 2.2.6 FIB-FESEM

Durch die Nutzung der AURIGA®CrossBeam® Workstation (Zeiss) der AG Wanner im Hause, die per Definition ein FIB-FESEM (focused ion beam field emission scanning electron microscope) ist, konnten unverzerrte, gut alignierte Schnittbilder generiert werden. Hierfür musste der Eponblock (aus der *en bloc* Kontrastierung mit Os und UO<sub>2</sub><sup>+</sup>) einem weiteren Härtungsschritt bei 100°C für zwei Tage unterzogen werden. Anschließend wurde er mit einer Rasierklinge grob vorgetrimmt und mit Epon auf einen speziellen Halter aufpolymerisiert.

#### Abbildung 3: FIB-FESEM. ▶

**A:** Sekundärelektronenbild der „Mesa“.

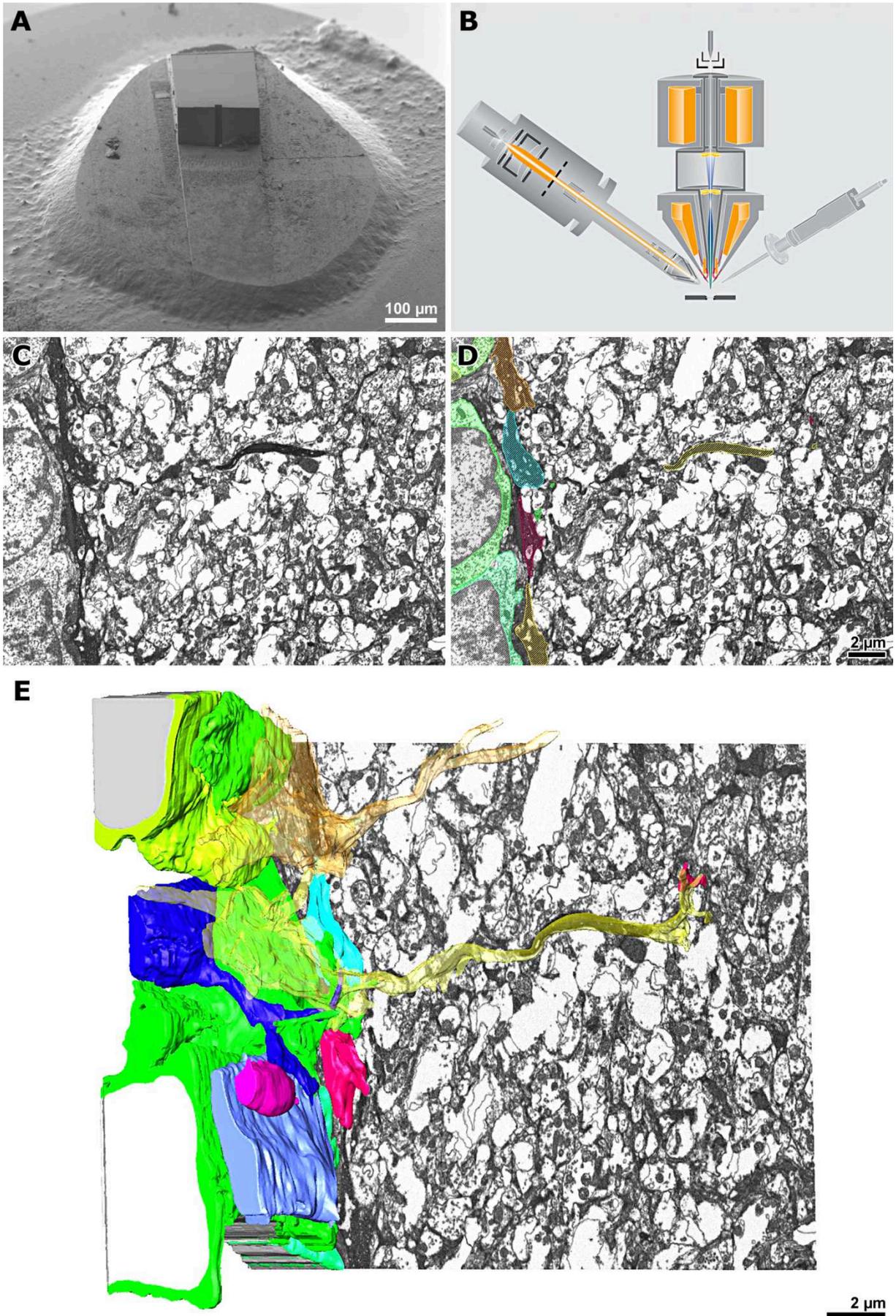
**B:** Hauptkomponenten der AURIGA® CrossBeam® Workstation (Zeiss): GEMINI® elektronenoptische Säule (Mitte), fokussierter Ionenstrahl (links) und Gasinjektionssystem (rechts).

**C:** Bild 290.

**D:** Bild 290 mit schraffiert dargestellten Materialien (Maßstab gilt auch für **C**).

**E:** Bild 290 mit 3D-Oberflächenmodellen der Materialien.

**hellgrau:** Zellkerne, **hellgrün:** Zellen der äußeren Körnerschicht, **gelb und orange transparent:** Photorezeptorterminals mit Fortsätzen tiefer in die äußere plexiforme Schicht, **blau:** weitere Zelle der äußeren Körnerschicht, **pink, türkis und hellblau:** weitere Photorezeptorterminals.



Mit Glasmessern wurde dann die „Mesa“ (s. Abb. 3A) am Ultramikrotom MT-7000 der Firma RMC getrimmt. Zur Bearbeitung am FIB-FESEM musste die Probe noch leitfähig gemacht werden, was durch Kohlenstoffbedampfung geschah (Balzers High Vacuum Evaporator BAE 121, Liechtenstein; Schichtdicke 15 nm, gemessen mit einem BalTec QSG 100 Quartz Film Thickness Monitor). Dann wurde die Probe ins Innere des FIB überführt, wo mit einem Gallium-Ionenstrahl abwechselnd definierte Schichten von der Eponoberfläche abgetragen werden und die Blockfläche via Rückstreuielektronen abgebildet wird. So erhält man ungestörte, gut alignierte Schnittbilder in nahezu TEM-Qualität (siehe Abb. 3).

## 2.2.7 Digitale Bildbearbeitung

### Digitalisierung

Die am Lichtmikroskop Olympus CX 41 digital fotografiert Schnitte der Schnittserien durch die Schlüpflinge und wurden im TIF-Format gespeichert (1600 x 1200 px, RGB).

Die am Olympus dotSlide komplett gescannten Objektträger wurden im vsi-Format gespeichert und zur weiteren Benutzung in das Programm OlyVia (Olympus) geladen. Hier wurden die Schnittbilder über Snapshots bildschirmfüllend herauskopiert und in Adobe® CreativeSuite® 5.0 als RGB-Bilder im TIF-Format abgespeichert.

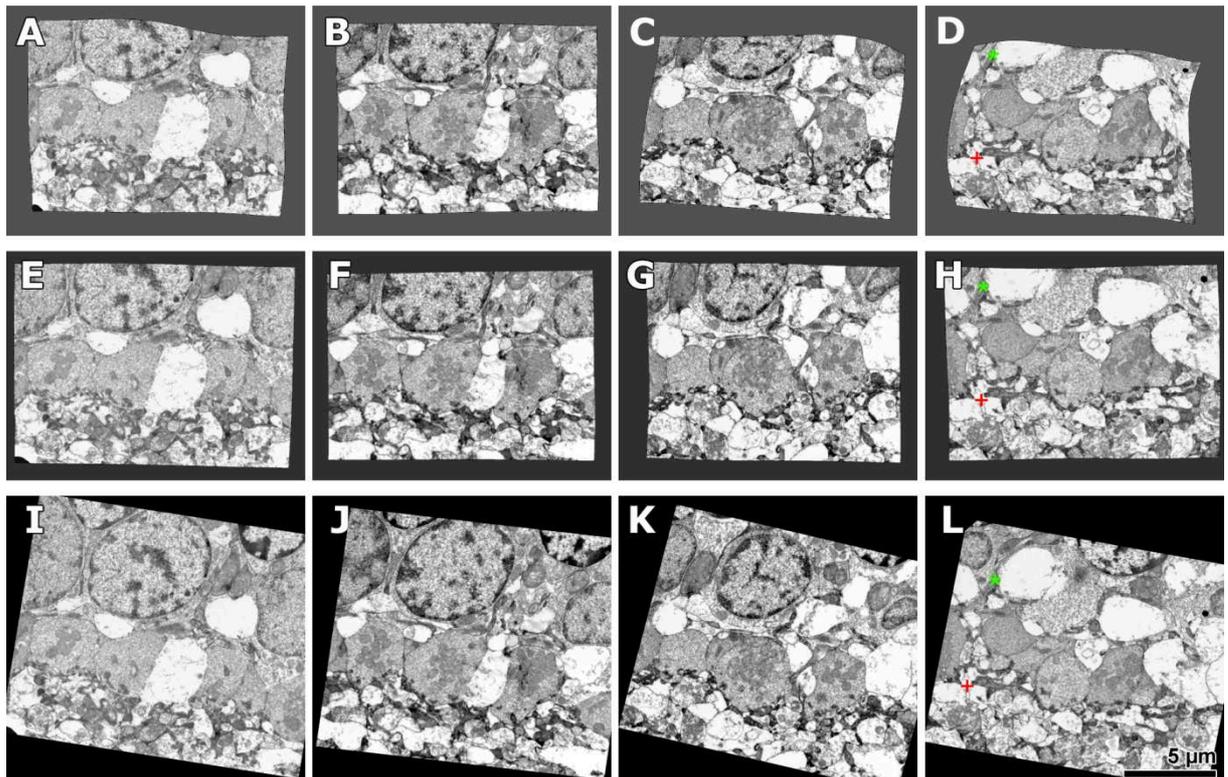
### Bildbearbeitung

Die aus den Semidünnschnittserien am **Lichtmikroskop** entstandenen digitalen RGB-Bilder wurden in Adobe® CreativeSuite® 5.0 in Graustufenbilder umgewandelt, kontrastverstärkt und unscharf maskiert. Um die Bilder in Amira® handhaben zu können, wurde teilweise die Bildgröße unter Erhalt des Ausschnitts reduziert.

Aus den am **CLSM** entstandenen Bildstapeln wurden im Programm Image J jeweils ein Einzelbild erstellt, indem über „stacks > z-project“ ein Bild mit der maximalen Intensität errechnet wurde. Danach wurden die Bilder im Programm Adobe® CreativeSuite® 5.0 mit der Funktion Autokontrast kontrastverstärkt und unscharf maskiert. Die Bilder der verschiedenen Farbkanäle wurden dann in einzelnen Ebenen übereinander gelegt und diese negativ miteinander multipliziert, um Mehrfarbenbilder zu erhalten.

### **Elastische Registrierung der TEM-Bilder**

Da die TEM-Bilder aufeinanderfolgender Ultradünnschnitte beträchtliche Verzerrungen durch (1) unvermeidbare elektronenoptische Abbildungsfehler, (2) Schnittschrumpfung im Elektronenstrahl, und (3) mechanische Schnittstauchung beim Schneiden aufwiesen, die ein präzises Alignment für die 3D-Rekonstruktion erschwerten, mussten die Bilder zuvor elastisch registriert werden. Dazu wurden die am TEM aufgenommenen MIA-Bilder in Adobe® CreativeSuite® 5.0 in 8-bit Graustufenbilder umgewandelt, kontrastverstärkt, unscharf maskiert und auf eine einheitliche Bildgröße zugeschnitten. Dann wurden die Bilder in Amira® geladen und so gut wie möglich voraligniert. Zur weiteren Registrierung mussten die Bilder so zugeschnitten werden, dass die durch das Alignment entstandenen schwarzen Ränder entfernt wurden, und dann im Format 2D-TIF aus Amira® exportiert. Im Programm Fiji (Version vom 14.06.2010) wurden die unterschiedlichen elastischen Registrierungsmöglichkeiten getestet. Diese Funktionen konnten jedoch nicht am kompletten Stapel durchgeführt werden, da mit zunehmendem Abstand vom Referenzbild starke Verzerrungsartefakte auftraten. Deshalb wurden Versuche mit verschiedenen Stapelgrößen durchgeführt, um bessere Ergebnisse zu erzielen. Dabei wurde immer das Bild in der Stapelmitte als Referenzbild gewählt, das unverändert blieb. Bei der Hälfte des Bilderstapels (68 Bilder) war die Kapazität erschöpft und es entstanden unverwertbare Ergebnisse mit deutlich überzogenen Verkrümmungen (siehe Abb. 4A-D). Für kleine Teilstapel mit je fünf Bildern konnten gute Registrierungsergebnisse erzielt werden, es stellte sich jedoch als schwierig heraus, die einzelnen Teilstapel wieder zusammenzufügen ohne erneut Sprünge im Alignment aufgrund von Verzerrungen an benachbarten Stapelrändern zu erhalten (siehe Abb. 4 E-H). Erst durch den Einsatz einer neueren Version des Programms Fiji (07.03.2011) und der neuen Option „StackReg“ unter Registration bei Plugins (vorgestellt in Thevenaz et al. 1998), konnte der gesamte Bilderstapel im Ganzen ohne erkennbare Verzerrungen elastisch registriert werden (siehe Abb. 4I-L). Die registrierten Bilder wurden schließlich in Amira® geladen und manuell segmentiert.



**Abbildung 4: Vergleich der verschiedenen Ansätze zur elastischen Registrierung.**

**A-D:** Elastische Registrierung mit Fiji (Version vom 14.06.2010), jeweils die Hälfte der Bilder des Stapels verwendet.

**E-H:** Elastische Registrierung mit Fiji (Version vom 14.06.2010), jeweils Fünferstapel verwendet.

**I-L:** StackReg mit Fiji (Version vom 07.03.2011), der komplette Bilderstapel verwendet.

**A, E, I:** jeweils Bild 15; **B, F, J:** jeweils Bild 30; **C, G, K:** jeweils Bild 45; **D, H, L:** jeweils Bild 60.

Die grünen Sternchen und die roten Kreuze markieren jeweils dieselbe Struktur in den Bildern, die durch die verschiedenen Registrierungen teilweise verzerrt wurden.

### **Computergestützte 3D-Rekonstruktion mit Amira®**

In Amira® wurden die einzelnen Schnittbilder (Semiserien Kap. 3.1 und 3.2, EM-Serien Kap. 3.3) als Bilderstapel geladen und die entsprechende Voxelsize ( $x*y*z$ ) eingegeben. Als erstes wurde der Bilderstapel automatisch und danach noch manuell aligniert, damit die Bilder passgenau aufeinander lagen. Im Anschluss wurde ein Labelfield erzeugt, in dem die manuelle Segmentierung der einzelnen Organe bzw. zellulären Strukturen erfolgte. Dazu wurden auf jedem Bild die Strukturen mit Hilfe des Zauberstabs oder des Pinselwerkzeugs markiert und dann einem bestimmten Material mit einer bestimmten Farbe zugewiesen. Zur Vereinfachung wurde bei kontinuierlich fortlaufenden Strukturen nur jeder fünfte bis zehnte Schnitt markiert und dann zwischen diesen interpoliert. Zur Errechnung einer Oberfläche wurde zuerst das Labelfield verkleinert, indem durch den Befehl „resample“ jeweils vier benachbarte Pixel miteinander verschmolzen wurden, um die Datenmenge zu verringern. Mit „surfaceGen“ wurden dann die Oberflächenmodelle generiert, bei denen zur besseren Darstellung noch die Oberflächendreiecke mit Hilfe des „simplifiers“ auf vertretbar kleine Zahlen heruntergerechnet wurden. Um die Oberflächen zu glätten, wurde noch der Befehl „smooth surface“ mit 20 Wiederholungen angewandt, und die Modelle schließlich mit „surface view“ dargestellt. Hierbei wurde unter „more options“ die Einstellung „direct normals“ gewählt, um eine glatte Darstellung der Oberflächen zu erhalten. An den 3D-Modellen konnten dann Strecken und Entfernungen gemessen werden. Über „material statistics“ wurde außerdem das Volumen der zugewiesenen Organe ermittelt. Mittels „Snapshots“ wurden Bilder der 3D-Modelle in ausgewählten Perspektiven und Materialkonstellationen erstellt.

### **Tafelgestaltung**

In Adobe® CreativeSuite® 5.0 wurden aus den erzeugten digitalen Bildern Tafeln erstellt. Interaktive 3D-Modelle wurden mit Hilfe von Deep Exploration (Right Hemisphere) und Acrobat 9 Pro Extended eingefügt (abgewandelt nach Ruthensteiner und Heß 2008).

### **3. ERGEBNISSE**

---

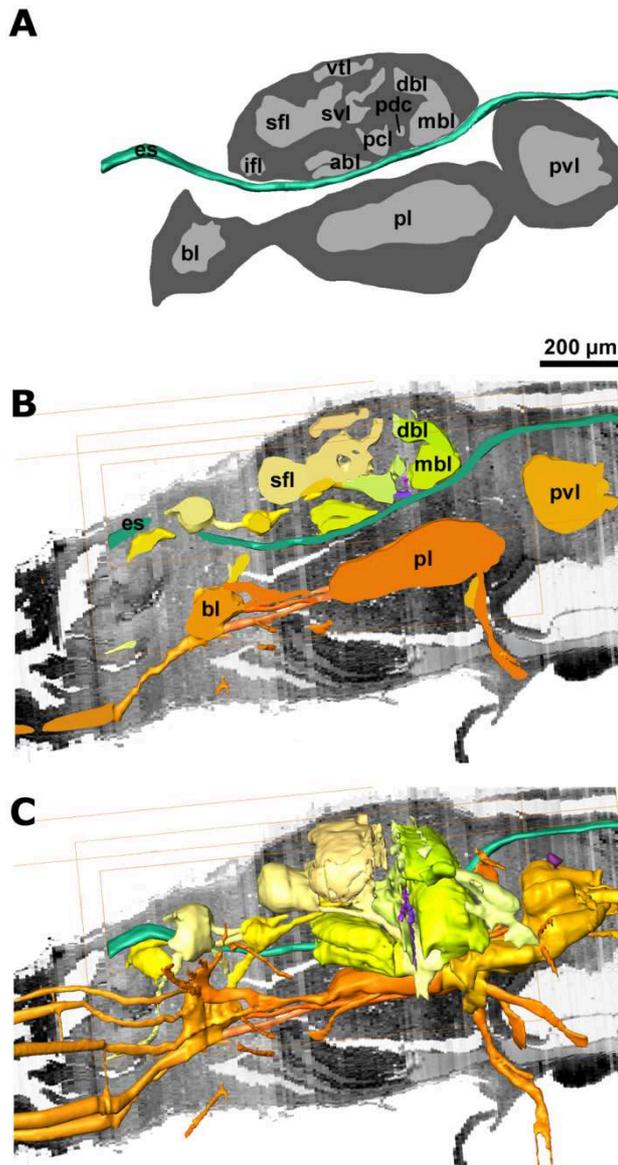
#### **3.1 Vergleichende 3D-Mikroanatomie und Histologie des Auges und des zentralen Nervensystems bei Schlüpflingen coleoider Cephalopoden**

Auf Grundlage der histologischen Transversalschnittserien (s. Kapitel 2.2.4) wurden mittels Alignierung, Segmentierung und 3D-Oberflächenrendering umfangreiche 3D-Strukturdatensätze der Kopfregion von sechs Arten coleoider Cephalopoden angefertigt. Diese Daten erlauben die detaillierte histologische und mikroanatomische Beschreibung, sowie Morphometrie des zentralen Nervensystems und der Augen der untersuchten Arten.

##### **3.1.1 Histologie und Mikroanatomie (allgemein)**

Im Allgemeinen besitzen alle untersuchten Schlüpflinge bereits gut entwickelte Augen und Nervensysteme. Letztere bestehen aus (1) einem peripheren Teil, der die Armnerven und -ganglien, sowie das Subradular- und Stellarganglion und die Buccalloben umfasst, und (2) einem sehr komplex gebauten zentralen Teil, der – orientiert an der Lage des Oesophagus – in eine sub- und eine supraoesophageale Masse unterteilt wird. Bei den coleoiden Cephalopoden findet man außerdem eine als perioesophageal bezeichnete Masse, die die sub- und supraoesophagealen Bereiche verbindet und der Ursprung des RiesennervenfaserSystems der Decabrachia ist.

Die Augen liegen in den mehr oder weniger voluminösen vorderen Kammern, die durch die Cornea und die Augenlider von der Außenwelt abgegrenzt werden (z.B. Abb. 13). Die für die lebhaften Augenbewegungen zuständigen Augenmuskeln wurden in dieser Arbeit nicht rekonstruiert, da sie bei den kleinen Schlüpflingen bei lichtmikroskopischer Auflösung nicht vollständig durch die Schnittserie verfolgt werden konnten. Das Gewebe der vorderen Kammerorgane füllt den Raum zwischen den zusammenlaufenden Krümmungen der Augen und der optischen Loben, wodurch sich eine abgeflachte ringförmige Struktur mit einer mesio-ventralen Lücke ergibt. Außerdem formen die sogenannten „weißen Körper“ (Young 1970; Claes 1996) kleinere Ringe an der Rückseite der Augen. Proximal der Cornea



**Abbildung 5: Mittsagittaler Schnitt durch das zentrale Nervensystem eines coleoiden Cephalopoden mit den Hauptneuropilen (*Loligo vulgaris*).**

**A:** Profile der sub- und supraoesophagealen Massen mit Neuropilen (hellgrau) und den Perikaryaschichten (dunkelgrau) (vergleiche z.B. mit Novicki et al. 1990: Fig. 14).

**B:** Digitaler YZ-reslice mit markierten Neuropilen (2D).

**C:** Digitaler YZ-reslice mit markierten Neuropilen (3D, gleiche Farben wie in B).

**abl:** vorderer Basallobus, **bl:** Brachiallobus, **dbf:** dorsaler Basallobus, **es:** Oesophagus, **ifl:** unterer Frontallobus, **mbl:** mittlerer Basallobus, **pcl:** Präkommissurallobus, **pdc:** Pedunkelkommissur, **pl:** Pedallobus, **pvl:** Pallioviscerallobus, **sfl:** oberer Frontallobus, **svl:** Subvertikallobus, **vtl:** Vertikallobus.

liegen die dorsalen und ventralen Lappen der Iris, die die Pupille formen, durch die das Licht zur Linse gelangt. Die Linse wird durch das Septum in ein anteriores und ein posteriores Segment unterteilt (z.B. Abb. 13) und ist dorsal und ventral am Ziliarkörper aufgehängt, der die Linse zur Akkommodation axial bewegt. Bei der histologischen Präparation widersetzen sich die Linsen oft einer vollständigen Infiltration durch das Fixativ und brechen manchmal am Septum oder zwischen Rinde und Kern auseinander, was einen histologischen Vergleich erschwert.

**Die Retina** besteht aus Photorezeptorzellen und Stützzellen. Die photorezeptiven Segmente der Photorezeptorzellen sind zum Licht hin ausgerichtet und bilden den am weitesten distal gelegenen Teil der Retina (Abb. 14: ds). Basal sind diese distalen Segmente von dunklen Pigmentkörnern umgeben, die in geringen Mengen abhängig von Retinaregion und Art (und vom Adaptationszustand der Retina) auch entlang der Segmente und distal von ihnen gefunden werden. Die Pigmentschicht erstreckt sich im Augenhintergrund auch bis zur Innenseite des Ziliarkörpers und kann zusätzlich an der Innenseite der Iris gefunden werden. An der Basis der distalen Segmente liegen die Somata der Stützzellen mit ihren Zellkernen. Die Photorezeptorzellen passieren die Basalmembran und formen die proximalen Segmente mit den dort gelegenen Zellkernen. Ihre Axone starten im retinalen Plexus, ziehen durch den Augenknochen (peripher verdickt) und laufen dann über ein Chiasma zur Peripherie der optischen Loben. Hier projizieren die optischen Nerven in die Retina profunda, d.h. den distalen Teil der optischen Loben, welche in eine äußere Körnerschicht, eine äußere plexiforme Schicht und eine innere Körnerschicht unterteilt ist (Abb. 15). An diese „tiefe Retina“ schließt sich die Medulla an, die den mittleren Teil der im Tangentialschnitt oft bohnenförmigen optischen Loben bildet und ist aus einem Gefüge von Neuropil und dazwischen liegenden Zellkerninseln zusammengesetzt ist. Die Neuropile der beiden optischen Loben sind miteinander über die optische Kommissur verbunden, die in einen dorsalen und einen ventralen Anteil unterteilt werden kann (Abb. 16). Der dorsale Teil verläuft nahe der Pedunkelkommissur, die die beiden Pedunkelloben miteinander verbindet, und über den Oesophagus. Der ventrale Teil liegt noch näher am Oesophagus und ist manchmal im Vergleich zum dorsalen Teil leicht nach vorne (z.B. bei *Sepia officinalis*) oder nach hinten (z.B. bei *Octopus vulgaris*) verschoben.

**Das periphere Nervensystem** beginnt anterior mit den Armnerven, die sich in den Armachsen zu den Intrabrachialganglien verdicken, die ca. 25-30% des gesamten Armdurchmessers einnehmen. Basal der Armkrone sind die Intrabrachialganglien über die Interbrachialkommissuren miteinander verbunden (Abb. 17).

**Das zentrale Nervensystem** ist in zahlreiche Loben unterteilt. Für eine einheitliche Nomenklatur der einzelnen Komponenten wurde im Wesentlichen die Einteilung nach Dietl (1878) herangezogen, wie es auch schon andere Autoren für die Gehirne adulter Cephalopoden taten und diese verfeinerten (z.B. *Loligo*: Young 1974, 1976b, 1977, 1979; Messenger 1979; und *Octopus vulgaris*: Young 1971).

In der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Loben des ZNS anhand ihrer Neuropile unterschieden, da diese gut voneinander abzugrenzen waren, während die Übergänge bei den Kernregionen (Perikaryamassen) oft nur schwer auszumachen waren (Abb. 5, 16).

Die **suboesophageale Masse** besteht aus den Brachial- (anterior), Pedal- (median) und Palliovisceralloben (posterior), die durch die drei Brachiopedalkonnektive und die zwei Brachiopalliovisceralkonnektive miteinander verbunden sind (Abb. 19, 20). Die pedalen und palliovisceralen Neuropile gehen ohne ausgeprägte Konnektive ineinander über, wobei sie in der Mitte einen Raum freilassen, der von Blutgefäßen ausgefüllt wird. Am frontalen Ende der Palliovisceralloben kann man am Neuropil dorsolateral mehr oder weniger deutlich zwei Ausbuchtungen erkennen, nämlich die Flossen- und die Chromatophorenloben (Abb. 12, 17). In den Pedalloben entspringen einige Nerven, die in den Schnittserien der sechs untersuchten Schlüpflinge mit unterschiedlichem Erfolg verfolgt werden konnten (Abb. 17):

- Die oberen / unteren Antorbitalnerven (Nervus antorbitalis superior/inferior) entspringen frontal, verlaufen mit den Brachiopedalkonnektiven und führen dann nach oben / unten zur Kopfmuskulatur.
- Die Postorbitalnerven (Nervus postorbitalis) führen vom oberen Hinterende der Pedalloben nach oben, um mit Muskeln im hinteren Bereich des Kopfes in Kontakt zu treten.
- Die okulomotorischen Nerven (Nervus oculomotorius posterior/anterior inferior/superior) ziehen zu den Augenmuskeln: die vorderen entspringen lateral aus dem zentralen Teil der Pedalloben, die hinteren kommen vom Hinterende der Pedalloben, wobei die oberen nach oben und seitwärts wegziehen und um die optischen Loben herum verlaufen und die unteren nach unten und seitwärts ziehen und dann mit dem olfaktorischen Nerv, der aus der supraoesophagealen Masse

kommt, ventral um die optischen Loben herum verlaufen, bis sie nicht mehr verfolgt werden können.

- Die oberen (vorderen und hinteren) ophthalmischen Nerven (Nervus ophthalmicus anterior/posterior superior) projizieren von den oberen hinteren Pedalloben nach oben und vorne zu der Haut um die Augen.
- Die unteren hinteren ophthalmischen Nerven (Nervus ophthalmicus posterior inferior) verlassen die Pedalloben gemeinsam mit den vorderen Trichternerven.
- Die vorderen Kopfrückziehnerven (Nervus retractor capitis anterior) führen vom oberen hinteren Ende der Pedalloben seitwärts und nach hinten zur Kopfmuskulatur.
- Die vorderen Trichternerven (Nervus infundibuli anterior) verlassen die Pedalloben in breiten Kabeln direkt hinter der ventralen Magnocellularkommissur und ziehen nach ventral. Bei *S. officinalis* und *I. notoides* verzweigen sich diese Kabel einige 100 µm unter den Pedalloben und die einzelnen Bündel verlaufen weiter nach ventral und frontal in den Trichter.
- Der unpaare mittlere Trichternerv (Nervus infundibuli medianus) wurde nur bei *I. notoides* und *L. vulgaris* gefunden und verläuft direkt zwischen den vorderen Trichternerven.
- Bei *S. officinalis*, *I. notoides* und *L. vulgaris* können zwei Bündel von Cristanerven (Nervus cristae staticae) entdeckt werden, die nach ventral und nach hinten verlaufen und die Cristae der Statocysten innervieren.

Auch von den Palliovisceralloben entspringen einige Nerven, wovon die meisten in den hinteren Körperteil des Schlüpflings ziehen (Abb. 12, 17):

- Die Pallialnerven (Nervus pallialis) sind stark ausgebildet und führen von den Palliovisceralloben seitwärts und nach hinten zu den Stellarganglien, die an der dorsalen Mantelwand gelegen sind, aber nur bei *S. obscura* und *O. vulgaris* rekonstruiert wurden.
- Die Kragennerven (Nervus collaris) entspringen zwischen den Flossenloben und den Pallialnerven und ziehen nach lateral.
- Die hinteren Trichternerven (Nervus infundibuli posterior) verlaufen aus dem

ventralen Mittelteil der Palliovisceralloben kommend nach latero-ventral in den Trichter.

- Die hinteren Kopfrückziehnerven (Nervus retractor capitis posterior) ziehen nach hinten und verlaufen, soweit sie verfolgt werden konnten, parallel der Pallialnerven.
- Die Visceralnerven (Nervus visceralis) liegen zwischen den Pallialnerven und führen geradewegs nach hinten.

Viele Nerven der Schlüpflinge sind in der gegebenen Fixierungsqualität bzw. schlicht aufgrund ihrer Dimensionen zu dünn, um mit der angewandten Methode in lichtmikroskopischer Auflösung zu ihrem Innervierungsort verfolgt werden zu können.

Die **supraoesophagealen Masse** kann in bis zu achtzehn Loben unterteilt werden, deren Verbindungen am besten an den Neuropilen alleine (d.h. ohne Betrachtung der Perikaryamassen) verstanden werden können (Abb. 18). Anterior beginnt es mit den unteren Buccalloben, die z.B. über die Mandibular- und Maxillarnerven den Schnabel innervieren und von denen die sympathischen Nerven parallel zum Oesophagus nach hinten zum „Magenganglion“ (gastric ganglion) ziehen. Sie sind über die Interbuccalkonnektive mit den oberen Buccalloben verbunden, von denen am Interbuccalkonnektiv entlang nach ventro-lateral das Cerebrosubradularkonnektiv zum Subradularganglion verläuft, das in der Buccalmasse in der Nähe des vorderen Endes des hinteren Speicheldrüsengangs liegt. Die oberen Buccalloben und die unteren Frontalloben sind über das Cerebrobuccalkonnektiv miteinander und mit dem Brachiallobus über die Buccobrachial- bzw. die Cerebro-brachialkonnektive verbunden. Von den unteren Frontalloben führen die Cerebralkonnektive nach hinten zum Präkommissurallobus (und vielleicht zum Subvertikallobus). Die oberen Frontalloben sind über breite laterale Trakte mit dem Vertikallobus und über kurze Neuropile mit den Subvertikalloben verbunden. Außerdem ziehen lange Bündel zu den optischen Loben. Die Neuropile des Vertikallobus formen eine breite Kuppel, die direkt über den Subvertikalloben sitzt. Diese sind nach hinten mit dem Präkommissurallobus verbunden und nach lateral mit den optischen Loben. Der Präkommissurallobus ist eine bogenförmige Struktur, die vor den optischen Kommissuren und der Pedunkelkommissur liegt und nach hinten mit den medianen Basalloben und seitlich mit den optischen Loben verbunden ist. Ventral von Subvertikal- und Präkommissurallobus und direkt über dem Oesophagus liegt der

vordere Basallobus, der nach posterior über die interbasalen Neuropile mit den mittleren Basalloben verbunden ist, die zur Seite hin in die lateralen Basalloben und nach hinten oben in den dorsalen Basallobus übergehen. Lateral hängen am dorsalen Basallobus die dorso-lateralen Loben, unter denen man die olfaktorischen Loben findet, die über den olfaktorischen Nerv das Geruchsorgan innervieren. An beiden Seiten der supraoesophagealen Masse liegen die Pedunkelloben, die durch ihre abgeflachte Struktur auffallen und die mediane Oberfläche der optischen Loben berühren.

Die **perioesophageale Masse** besteht aus den dorsalen, ventralen und posterioren Magnocellularloben, deren Neuropile kontinuierlich ineinander übergehen. Die Magnocellularloben beginnen ventro-lateral der Pedalloben, sind über eine Kommissur genau ventral der Pedalloben miteinander verbunden und verlaufen lateral bis zu den Palliovisceralloben. Bei den Decabrachia befinden sich im ventralen Magnocellularlobus außerdem die Riesennervenzellen erster Ordnung. Die Brachiomagnocellularverbindungen begleiten die Brachiopalliovisceralverbindungen ventral (Abb. 20A) und führen zu den ventralen Anteilen der Magnocellularloben.

**Tabelle 10: Die Loben des Cephalopoden-ZNS und ihre Funktionen** (nach Young 1971; Budelmann et al. 1997; Nixon und Young 2003).

	<b>Loben</b>	<b>Funktionen und funktionelle Gliederung</b>
<b>suboesophageal</b>	Brachiallobus	<i>Bewegungen der Arme und Saugnäpfe, Verarbeitung der chemotaktilen Informationen von den Saugnäpfen</i>
	Pedallobus	<i>Intermediäre und niedere motorische Zentren der Arme, des Trichters und der Augenmuskeln</i>
	Pallioviscerallobus	<i>Bewegungen des Mantels und der Eingeweide</i>
<b>supraoesophageal</b>	Unterer und hinterer Buccallobus	<i>Kontrolle der motorischen Funktionen der Buccalmasse</i>
	Unterer Frontallobus	<u>Unteres Frontalsystem</u> <i>Verarbeitung der chemo-taktilen Informationen der Arme</i>
	Oberer Buccallobus	<i>Kontrolle der motorischen Funktionen der Buccalmasse</i>
	Subfrontallobus (nur bei Octobranchia)	<i>Motorik der Arme und Saugnäpfe</i>
	Vertikallobus Subvertikallobus Präkommissurallobus Oberer Frontallobus	<u>Vertikalissystem</u> <i>Lernverhalten und Gedächtnis, Verarbeitung der visuellen Informationen der optischen Loben</i>
	Vorderer anteriorer Basallobus Hinterer anteriorer Basallobus	<u>Anteriore Basalloben</u> <i>Höhere motorische Zentren: Kontrolle der Bewegung und der Position von Kopf und Augen, Beutefang</i>
	Dorsale Basalloben Mediane Basalloben Laterale Basalloben Interbasalloben Dorso-laterale Loben Subpedunkulate Loben	<u>Posteriore Basalloben</u> <i>Höhere motorische Zentren: Kontrolle des Schwimmens (Trichter, Mantel) und der Atmung Kontrolle der Chromatophoren und der Muskeln der Haut</i>
	Pedunkellobus	<i>Teil der visuell gesteuerten motorischen Kontrolle, koordiniert den Farbwechsel und den Tintenausstoß</i>
	Olfaktorischer Lobus	<i>Verarbeitung der Informationen des Geruchsorgans</i>
	<b>perioesophageal</b>	Dorsaler, ventraler und posteriorer Magnocellularlobus
<b>Optische Loben</b>		<i>Verarbeitung der visuellen Informationen</i>

Auch wenn das Nervensystem und die Augen aller sechs untersuchten Schlüpflinge dem gleichen Grundplan folgen, unterscheiden sie sich doch in Größe, Proportionen und Komplexität.

### 3.1.2 *Sepia officinalis*

Der Schlüpfling von *S. officinalis* ist der größte der untersuchten (horizontaler Kopfdurchmesser ca. 3,5 mm) und hat deshalb auch die größten Augen und das größte Nervensystem. Als ein Vertreter der Decabrachia besitzt *S. officinalis* acht Arme und zwei Tentakel. Die acht Arme bilden einen Ring, der um die Mundöffnung und die Buccalmasse herum gelegen ist (Abb. 6B), während die beiden Tentakel zwischen Armpaar 3 und 4 verlaufen. Sie sind in Tentakeltaschen zurückgezogen, die jeweils zwischen den Basen von Arm 3 und 4 und unterhalb der Augenkammer liegen (Abb. 6C-F). Armpaar 4 besitzt laterale flossenähnliche Fortsätze, die es von den anderen Armen unterscheidet. Die Nerven der acht Arme sind durch eine komplexe Interbrachialkommissur miteinander verbunden, die die zwei Tentakelnerven nicht miteinbezieht (Abb. 12A). Anschließend (d.h. proximal) verdicken sich die Armnerven zu den Intrabrachialganglien. Die Tentakelnerven bleiben in ihrer Dicke konstant, übertreffen die Armnerven aber deutlich an Länge.

---

#### **Abbildung 6: *Sepia officinalis* Schlüpfling: Histologie der Kopfregion (Transversalschnitte; Richardsonfärbung).**

**A:** Übersicht mit ausgewählten Ebenen B-H (3D-Rekonstruktion, links laterale Ansicht).

**B:** Armkrone mit Armen und Tentakeln.

**C:** Basis der Armkrone nahe der Mundöffnung.

**D:** Mitte der Augen, Buccalmasse und vorderer Trichter.

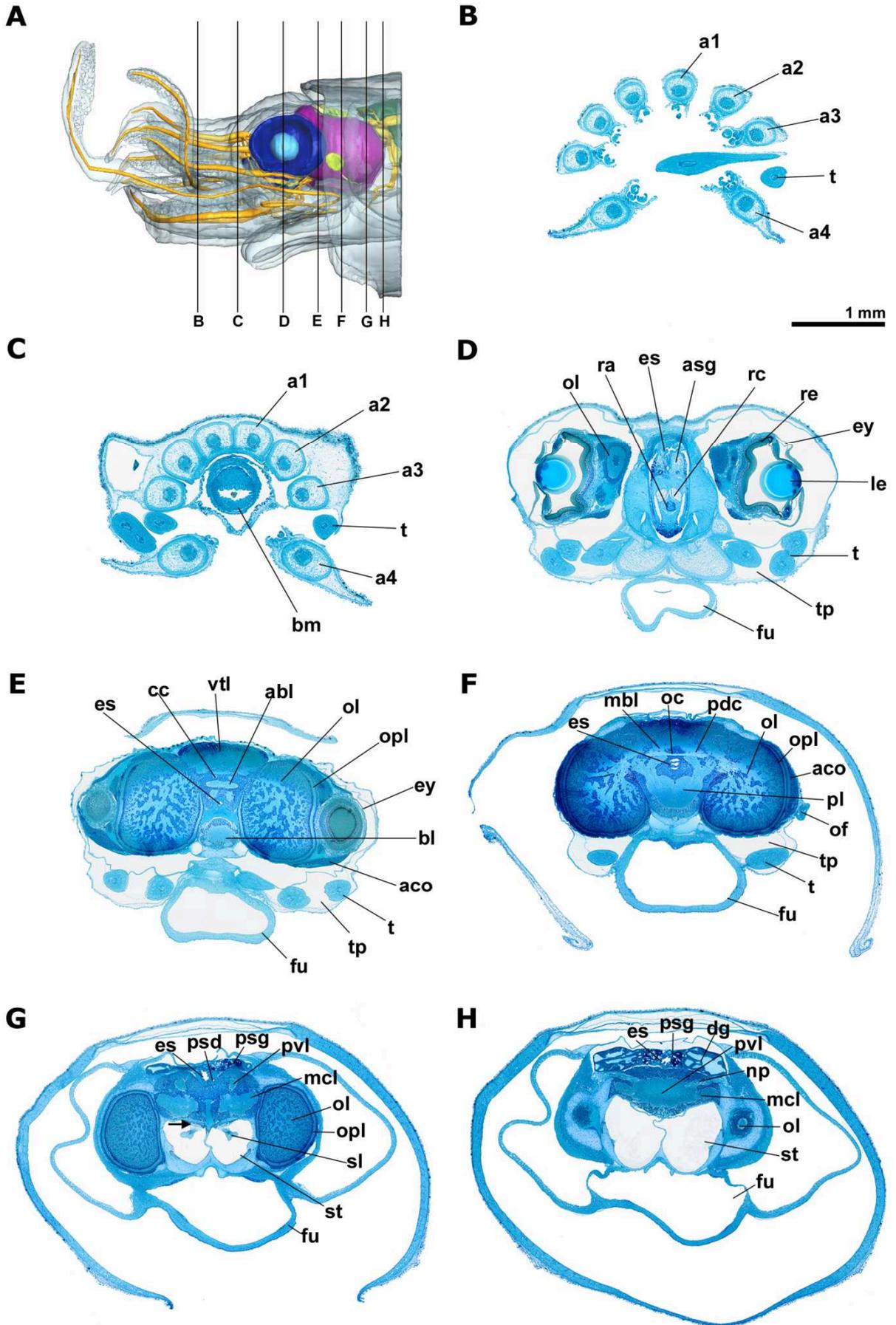
**E:** Optische Loben genau hinter den Augen.

**F:** Mitte der optischen Loben mit der optischen Kommissur.

**G:** Hintere optische Loben, Statocysten mit Statolithen.

**H:** Pallioviscerallobus genau hinter den optischen Loben.

**a 1-4:** Arme 1-4, **abl:** vorderer Basallobus, **aco:** vorderes Kammerorgan, **asg:** vordere Speicheldrüse, **bl:** Brachiallobus, **bm:** Buccalmasse, **cc:** Cerebralkonnektiv, **es:** Oesophagus, **ey:** Auge, **fu:** Trichter, **le:** Linse, **mbi:** mittlerer Basallobus, **mcl:** Magnocellularlobus, **np:** Pallialnerv, **oc:** optische Kommissur, **of:** Geruchsorgan, **ol:** optischer Lobus, **opl:** äußere plexiforme Schicht, **pd:** Pedunkelkommissur, **pl:** Pedallobus, **psd:** hinterer Speicheldrüsengang, **psg:** hintere Speicheldrüse, **ra:** Radula, **rc:** Radulaknorpel, **re:** Retina, **sl:** Statolith, **st:** Statocyste, **t:** Tentakel, **tp:** Tentakeltasche, **pvl:** Pallioviscerallobus, **vli:** Vertikallobus.



Die Augen liegen im Verhältnis zur horizontalen Mittellinie des Kopfes leicht dorsal, blicken nach horizontal und leicht nach vorne (Abb. 12A) und werden nach außen hin von einer ventral dünner werdenden Cornea abgeschlossen. Die vordere Augenkammer ist auffallend groß, auch wenn man eine leichte, fixierungsbedingte Schrumpfung der Augen in Betracht zieht, und reicht ventral bis zu den optischen Loben. In diesen Kammern liegen die Augen (horizontaler Durchmesser 1,3 mm) und sind über die Sehnerven mit den optischen Loben und über die okulomotorischen Muskeln mit den Trochlear- und Cranialknorpeln verbunden. Der weiße Körper und das vordere Kammerorgan füllen den Bereich zwischen den optischen Loben und den Augenbechern. Proximal an die Cornea schließt sich die Iris an, die die Pupille formt, durch die das Licht auf die mittig gelegene, kugelige Linse trifft. Die Linse (Durchmesser ca. 450 µm) ist durch ein Septum in einen distalen und einen proximalen Linsenteil getrennt (Abb. 13A: →), wobei das distale Segment ca. 20% des Gesamtdurchmessers einnimmt. Dorsal und ventral der Linse gelegen befindet sich der Ziliarkörper, an dem die Linse aufgehängt ist und mit dessen Hilfe sie zur Scharfstellung bewegt werden kann. Der Glaskörper zwischen Linse und Retina erscheint bei dieser Art vergleichsweise schmal und das dunkle retinale Pigment wird in den mittleren Bereichen des Augenbeckers immer dünner. Die Retinae kleiden die proximalen Hälften der Augenbecher schalenförmig aus (Abb. 13A, 14A).

---

**Abbildung 7: *Rossia macrosoma* Schlüpfling: Histologie der Kopfgregion (Transversalschnitte; Trichrome de Masson Färbung, außer F: Azanfärbung).** ►

**A:** Übersicht mit ausgewählten Ebenen B-H (3D-Rekonstruktion, links laterale Ansicht).

**B:** Basis der Armkrone mit Armen und Tentakeln.

**C:** Basis der Armkrone mit Buccalmasse.

**D:** Mitte der Augen mit Radula.

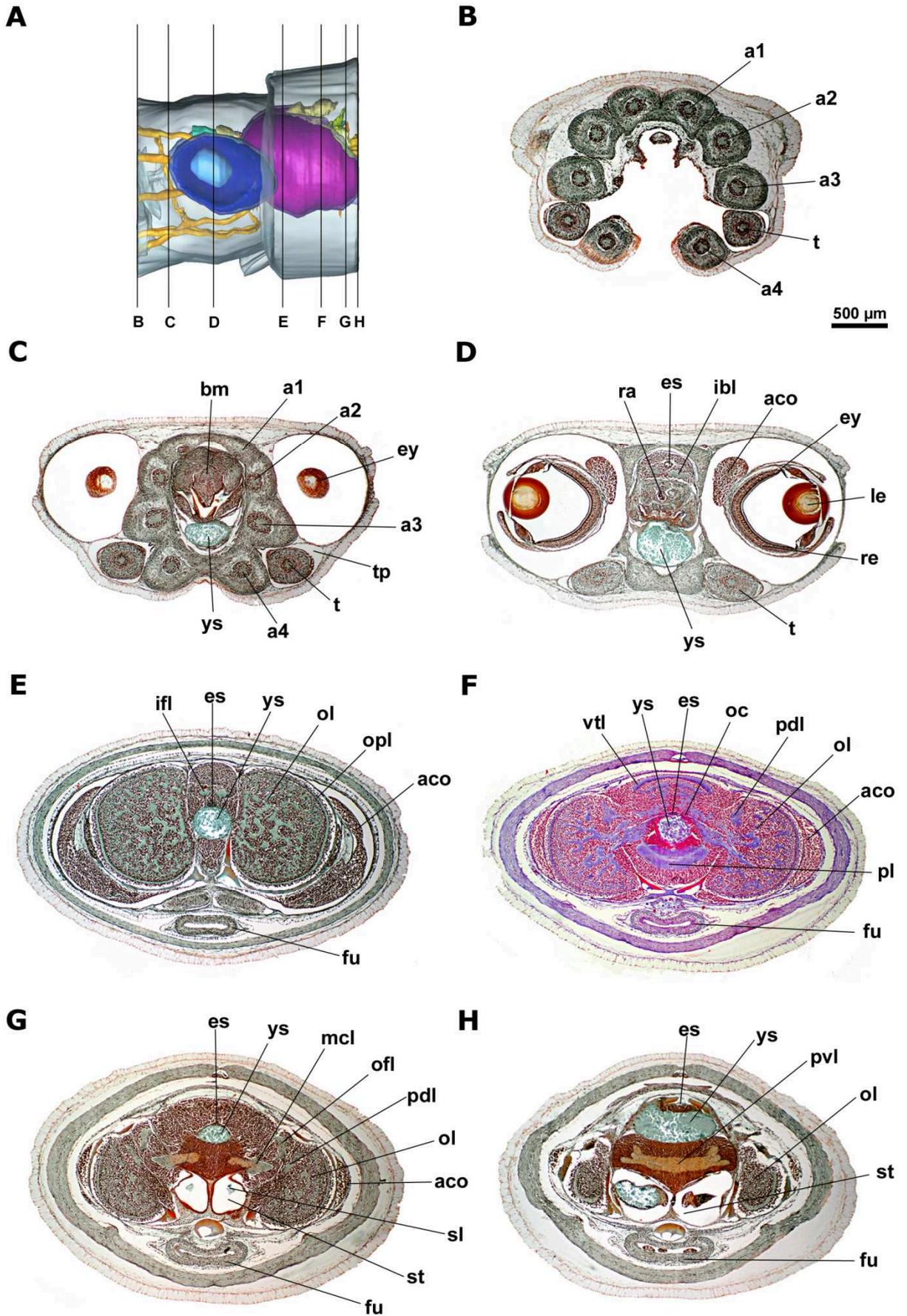
**E:** Optische Loben genau hinter den Augen.

**F:** Mitte der optischen Loben mit der optischen Kommissur.

**G:** Hintere optische Loben, Statocysten mit Statolithen.

**H:** Pallioviscerallobus genau am Ende der optischen Loben, Statocysten mit Statolithen.

**a 1-4:** Arme 1-4, **aco:** vorderes Kammerorgan, **bm:** Buccalmasse, **es:** Oesophagus, **ey:** Auge, **fu:** Trichter, **ibl:** unterer Buccallobus, **ifl:** unterer Frontallobus, **le:** Linse, **mcl:** Magnocellularlobus, **oc:** optische Kommissur, **ofl:** olfaktorischer Lobus, **ol:** optischer Lobus, **opl:** äußere plexiforme Schicht, **pdl:** Pedunkellobus, **pl:** Pedallobus, **ra:** Radula, **re:** Retina, **sl:** Statolith, **st:** Statocyste, **t:** Tentakel, **tp:** Tentakeltasche, **pvl:** Pallioviscerallobus, **vfl:** Vertikallobus, **ys:** Dottersack.



Die „tiefe Retina“ in der Peripherie des Lobus opticus besteht bei *S. officinalis* aus äußerer Körnerschicht, äußerer plexiformer Schicht und innerer Körnerschicht (Abb. 15A). Eine innere plexiforme Schicht kann nicht klar erkannt werden. Die äußere plexiforme Schicht wird dorsal zur Mitte hin immer dünner bis sie schließlich nicht mehr zu erkennen ist. Die Medulla setzt sich aus dem fein verzweigten Neuropil und dazwischen liegenden Zellkerninseln zusammen. Im 3D-Modell sind die optischen Loben transparent dargestellt und in ihrem Inneren sieht man das stark verzweigte Geflecht aus Neuropil, das nach außen kuppelartig von der äußeren plexiformen Schicht umgeben wird (Abb. 15D). Beim untersuchten Schlüpfling von *S. officinalis* erkennt man die über den Oesophagus verlaufende dorsale optische Kommissur gut, an die sich dorsal die Pedunkelkommissur anschließt, die die Pedunkelloben der beiden Körperseiten miteinander verbindet (Abb. 6F, 16A).

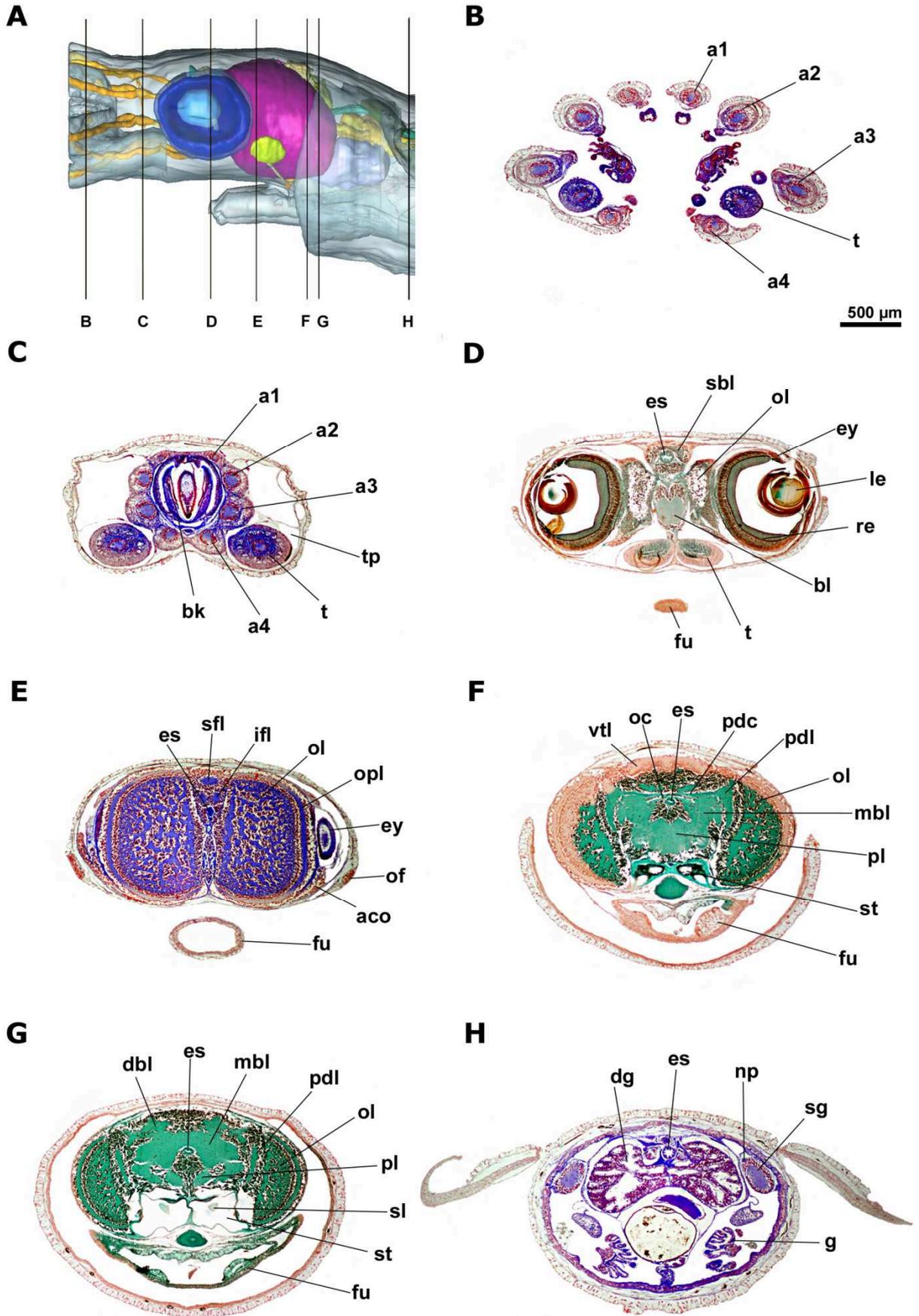
Auf den Transversalschnitten (Abb. 6E-H und digitaler Datenstapel) kann man die Abfolge der sub- und supraoesophagealen Loben im zentralen Nervensystem und des Oesophagus von anterior nach posterior nachvollziehen. Dabei liegen die Kerngebiete der Loben jeweils um das zentrale Neuropil herum, das in den 3D-Modellen stellvertretend exklusiv dargestellt ist.

---

**Abbildung 8: *Sepietta obscura* Schlüpfling: Histologie der Kopfreion (Transversalschnitte; B, C, E, H: Azanfärbung; D, F, G: Trichrome de Masson Färbung).** ►

- A:** Übersicht mit ausgewählten Ebenen B-H (3D-Rekonstruktion, links laterale Ansicht).
- B:** Armkrone mit Armen und Tentakeln.
- C:** Basis der Armkrone und Schnabel.
- D:** Mitte der Augen, Brachiallobus.
- E:** Optische Loben genau hinter den Augen, vorderer Trichter.
- F:** Mitte der optischen Loben mit der optischen Kommissur.
- G:** Hintere optische Loben, Statocysten mit Statolithen.
- H:** Stellarganglion, Kiemen und Mitteldarmdrüse.

**a 1-4:** Arme 1-4, **aco:** vorderes Kammerorgan, **bl:** Brachiallobus, **bm:** Buccalmasse, **dbl:** dorsaler Basallobus, **dg:** Mitteldarmdrüse, **es:** Oesophagus, **ey:** Auge, **fu:** Trichter, **g:** Kieme, **ifl:** unterer Frontallobus, **le:** Linse, **mbi:** mittlerer Basallobus, **np:** Pallialnerv, **oc:** optische Kommissur, **of:** Geruchsorgan, **ol:** optischer Lobus, **opl:** äußere plexiforme Schicht, **pd:** Pedunkelkommissur, **pl:** Pedallobus, **re:** Retina, **sbl:** oberer Buccallobus, **sfl:** oberer Frontallobus, **sg:** Stellarganglion, **sl:** Statolith, **st:** Statocyste, **t:** Tentakel, **tp:** Tentakeltasche, **vli:** Vertikallobus.



Die vordersten Loben des Nervensystems sind die Buccalloben. Bei *S. officinalis* konnte man erkennen, dass vom unteren Buccallobus (Abb. 18A: ibl) der linke und rechte Nervus sympathicus am Oesophagus entlang nach posterior zieht. Er konnte aber nicht weiter als bis zum Beginn des vorderen Basallobus verfolgt werden. Die Buccalloben, die Frontalloben und der Brachiallobus liegen besonders eng beieinander, wodurch die Konnektive zwischen den Loben sehr kurz sind. Besonders auffällig ist dies beim Cerebrobuccalkonnektiv (Abb. 18A: cbc), das den oberen Buccallobus (sbl) und den unteren Frontallobus (ifl) miteinander verbindet.

Außerdem liegen die Buccobrachialkonnektive und die Cerebrobrachialkonnektive bei *S. officinalis* besonders eng beieinander, weswegen sie bei ihrem Eintritt in den Brachiallobus schwer zu unterscheiden waren.

Gut zu verfolgen, waren das Interbuccalkonnektiv zwischen den beiden Buccalloben und das Cerebrosubradularkonnektiv, das vom oberen Buccallobus ausgeht und am unteren Buccallobus vorbeizieht. Auch konnten die Austrittsstellen der Labialnerven aus dem oberen Buccallobus erkannt (Abb. 18A: ►), die Nerven aber nicht zu ihrem peripheren Projektionsort verfolgt werden.

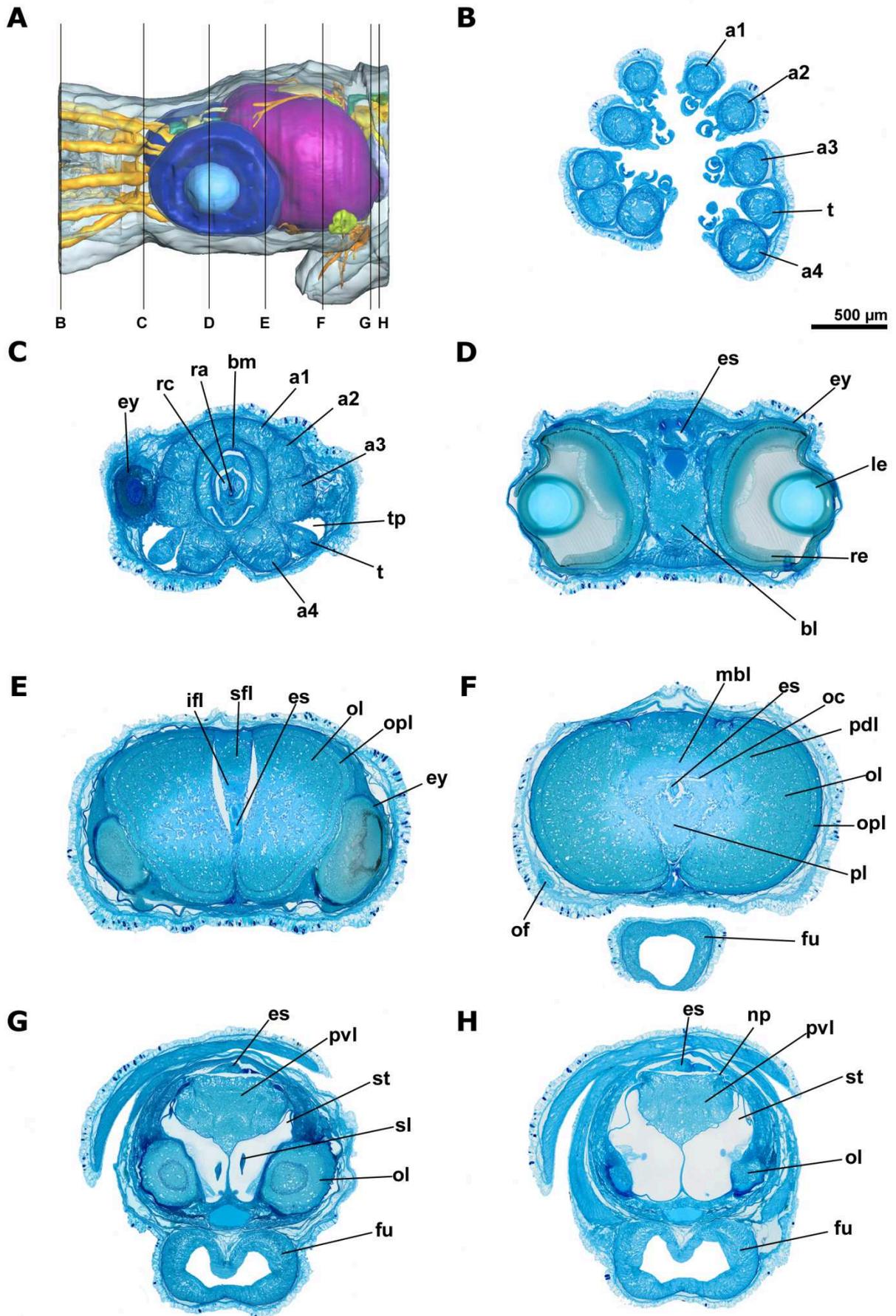
Zwischen dem Brachiallobus und dem anterioren Pedallobus verlaufen viele Konnektive und Nerven, die sich am histologischen Transversalschnitt als verschiedene Nervenstränge umge-

---

**Abbildung 9: *Idiosepius notoides* Schlüpfling: Histologie der Kopfregion (Transversalschnitte; Richardsonfärbung).** ►

- A:** Übersicht mit ausgewählten Ebenen B-H (3D-Rekonstruktion, links laterale Ansicht).
- B:** Armkrone mit Armen und Tentakeln.
- C:** Basis der Armkrone nahe der Mundöffnung, Buccalmasse.
- D:** Mitte der Augen, Brachiallobus.
- E:** Optische Loben genau hinter den Augen.
- F:** Mitte der optischen Loben mit der optischen Kommissur, vorderer Trichter.
- G:** Hintere optische Loben, Statocysten mit Statolithen.
- H:** Pallioviscerallobus genau hinter den optischen Loben, Statocysten.

**a 1-4:** Arme 1-4, **bl:** Brachiallobus, **bm:** Buccalmasse, **es:** Oesophagus, **ey:** Auge, **fu:** Trichter, **le:** Linse, **mbi:** mittlerer Basallobus, **np:** Pallialnerv, **oc:** optische Kommissur, **of:** Geruchsorgan, **ol:** optischer Lobus, **opl:** äußere plexiforme Schicht, **pdl:** Pedallobus, **pl:** Pedallobus, **ra:** Radula, **rc:** Radulaknorpel, **re:** Retina, **sfl:** oberer Frontallobus, **sl:** Statolith, **st:** Statocyste, **t:** Tentakel, **tp:** Tentakeltasche, **pvl:** Pallioviscerallobus.



ben von Zellkernen gut erkennen lassen (Abb. 19A). Am weitesten dorsal gelegen sind die oberen Antorbitalnerven, an die sich ventral die vorderen unteren ophthalmischen Nerven anschließen. Darunter folgen die Brachiopalliovisceralkonnektive, von denen auf Höhe des anterioren Pedallobus die Brchiomagnocellular-konnektive abzweigen, welche nur bei *S. officinalis* gefunden werden konnten, und die beiden paarigen Brachiopedalkonnektive. In der Mitte liegt noch das unpaar erscheinende dritte Brachiopedalkonnektiv (Abb. 19A). Lateral der bisher beschriebenen Nerven verlaufen noch die vorderen Augenmuskelnerven, die im Pedallobus entspringen und streckenweise direkt neben den Brachiopalliovisceralkonnektiven verlaufen, bis sie nach latero-ventral abzweigen und die Augenmuskeln innervieren. Ventral der Pedalloben formen die vorderen Trichternerven einen auffälligen Knoten (Abb. 17A), von dem aus sich dann mehrere Nervenbündel abspalten und die Trichtermuskulatur innervieren.

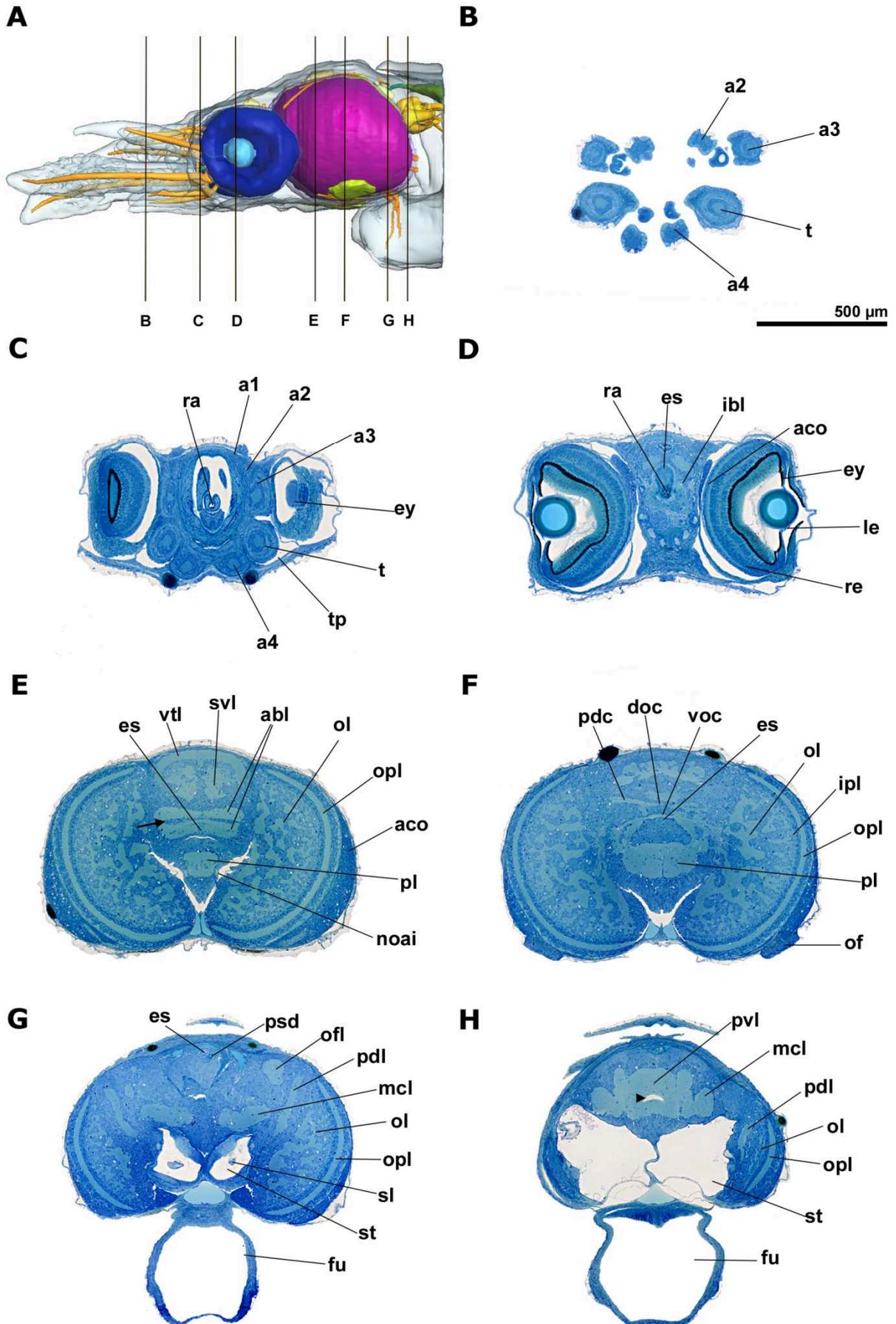
Die Statocysten sind aufgrund ihrer robusten Knorpelkapsel gut erhalten und besitzen einen tangentialen Durchmesser von maximal 830  $\mu\text{m}$ . Innerhalb der Statocysten findet man jeweils einen Statolithen, der an der Macula princeps aufgehängt ist (Abb. 6G:  $\rightarrow$ ). Außerdem kann man mehrere knorpelige Vorsprünge erkennen. Die olfaktorischen Organe sind oval, mit einer Ausdehnung von 430 x 260  $\mu\text{m}^2$  und einer maximalen Dicke von 100  $\mu\text{m}$ , und liegen lateral direkt hinter den Augen und ventral der optischen Loben (Abb. 6F, 12A).

---

**Abbildung 10: *Loligo vulgaris* Schlüpfling: Histologie der Kopfregion (Transversalschnitte; Richardsonfärbung).** ▶

- A:** Übersicht mit ausgewählten Ebenen B-H (3D-Rekonstruktion, links laterale Ansicht).  
**B:** Armkrone mit Armen und Tentakeln.  
**C:** Basis der Armkrone nahe der Mundöffnung.  
**D:** Mitte der Augen, Radula.  
**E:** Optische Loben genau hinter den Augen, vorderer Basallobus.  
**F:** Mitte der optischen Loben mit der optischen Kommissur, Pedallobus.  
**G:** Hintere optische Loben, Statocysten mit Statolithen.  
**H:** Pallioviscerallobus genau am Ende des optischen Lobus, Statocysten.

**a 1-4:** Arme 1-4, **abl:** vorderer Basallobus, **aco:** vorderes Kammerorgan, **doc:** dorsale optische Kommissur, **es:** Oesophagus, **ey:** Auge, **fu:** Trichter, **ibl:** unterer Buccallobus, **ipl:** innere plexiforme Schicht, **le:** Linse, **mcl:** Magnocellularlobus, **noai:** Nervus oculomotorius anterior inferior, **of:** Geruchsorgan, **ofl:** olfaktorischer Lobus, **ol:** optischer Lobus, **opl:** äußere plexiforme Schicht, **pdcl:** Pedunkelkommissur, **pdl:** Pedunkellobus, **pl:** Pedallobus, **ra:** Radula, **re:** Retina, **sl:** Statolith, **st:** Statocyste, **svl:** Subvertikallobus, **t:** Tentakel, **tp:** Tentakeltasche, **pvl:** Pallioviscerallobus, **voc:** ventrale optische Kommissur, **vtl:** Vertikallobus.



### 3.1.3 *Rossia macrosoma*

Der Schlüpfling von *R. macrosoma* ist der zweitgrößte (horizontaler Kopfdurchmesser ca. 3,1 mm) der sechs untersuchten Arten, hat eine vergleichsweise dicke Epidermis und ist in der Augenregion dorso-ventral etwas abgeflacht. Auffällig ist ferner, dass der Schlüpfling noch einen Teil des Dottersacks besitzt, der ventral des Buccalapparates beginnt und sich dann auf Höhe der Brachialloben nach dorsal verlagert, so dass er zwischen sub- und supraoesophagealer Masse direkt ventral zum Oesophagus nach posterior zieht (Abb. 7C-H, 16B). Die Tentakel liegen in einer Tentakeltasche zwischen den jeweils dritten und vierten Armen, sind hier aber nicht wie bei *S. officinalis* zu einer Schleife gewunden (Abb. 7B-D). Die Armnerven wurden aufgrund der begrenzten Schnittserie nicht bis in ihre äußersten Spitzen dargestellt, sondern nur bis zum Beginn der Intrabrachialganglien (Abb. 12B). Die beiden Tentakelnerven verlaufen deutlich lateral der Armnerven und sind nicht an der Interbrachialkommissur beteiligt, die die Armnerven miteinander verbindet.

---

#### **Abbildung 11: *Octopus vulgaris* Schlüpfling: Histologie der Kopfreion (Transversalschnitte; Azanfärbung).**

**A:** Übersicht mit ausgewählten Ebenen B-H (3D-Rekonstruktion, links laterale Ansicht).

**B:** Armkrone, Dottersack.

**C:** Buccalmasse, vorderer Teil der Augen.

**D:** Mitte der Augen, Radula.

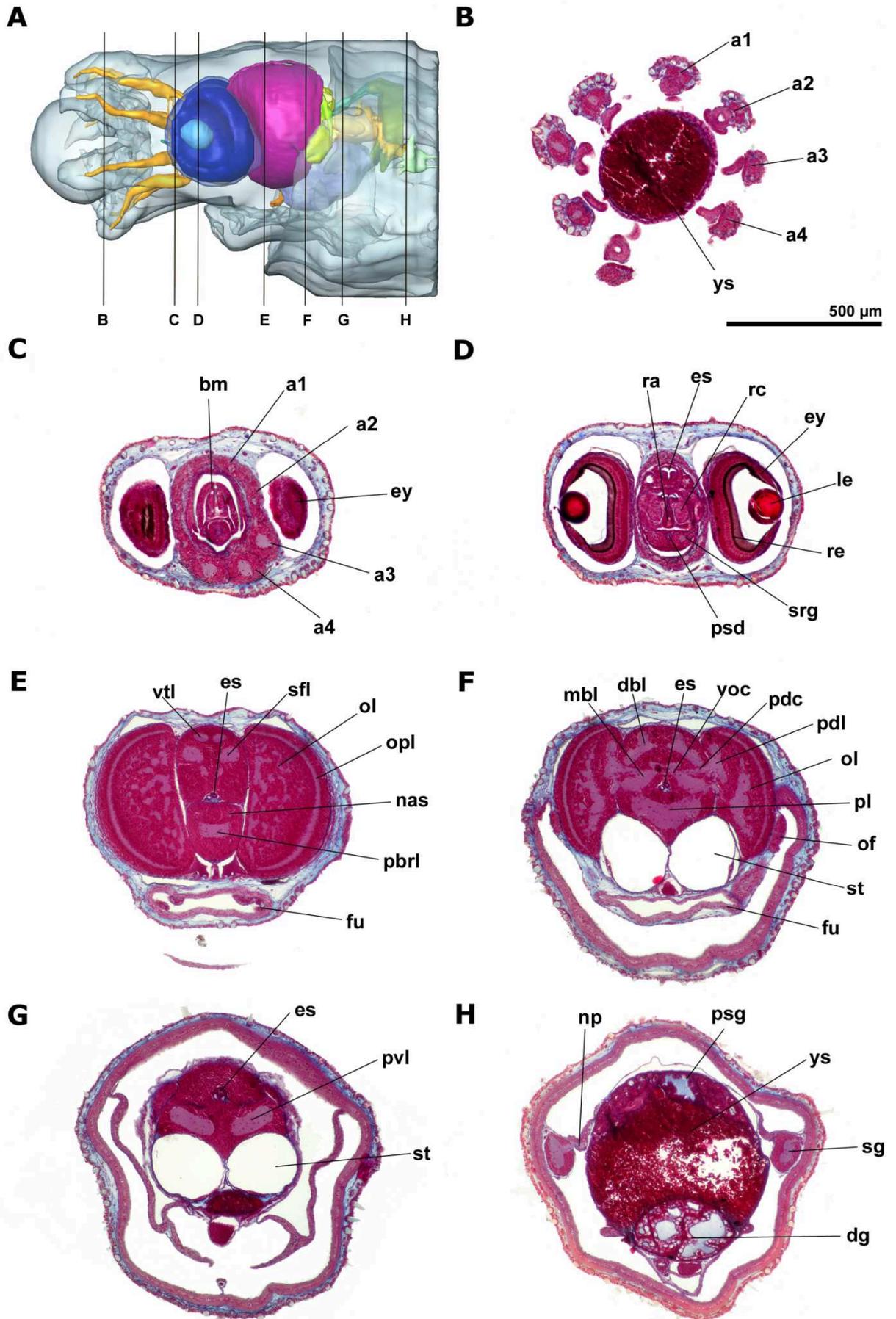
**E:** Mitte der optischen Loben genau hinter den Augen, vorderer Trichter.

**F:** Optische Loben mit der optischen Kommissur, Statocysten.

**G:** Pallioviscerallobus, Statocysten.

**H:** Stellarganglion, hintere Speicheldrüsen, Mitteldarmdrüse.

**a 1-4:** Arme 1-4, **bm:** Buccalmasse, **dbl:** dorsaler Basallobus, **dg:** Mitteldarmdrüse, **es:** Oesophagus, **ey:** Auge, **fu:** Trichter, **le:** Linse, **mbl:** mittlerer Basallobus, **nas:** Nervus antorbitalis superior, **np:** Pallialnerv, **ol:** optischer Lobus, **opl:** äußere plexiforme Schicht, **pbrl:** posteriorer Brachiallobus, **pdcl:** Pedunkelkommissur, **pdl:** Pedunkellobus, **pl:** Pedallobus, **psd:** hinterer Speicheldrüsengang, **psg:** hintere Speicheldrüse, **ra:** Radula, **rc:** Radulaknorpel, **re:** Retina, **sfl:** oberer Frontallobus, **sg:** Stellarganglion, **srg:** Subradularganglion, **st:** Statocyste, **voc:** ventrale optische Kommissur, **pvl:** Pallioviscerallobus, **vtl:** Vertikallobus, **ys:** Dottersack.



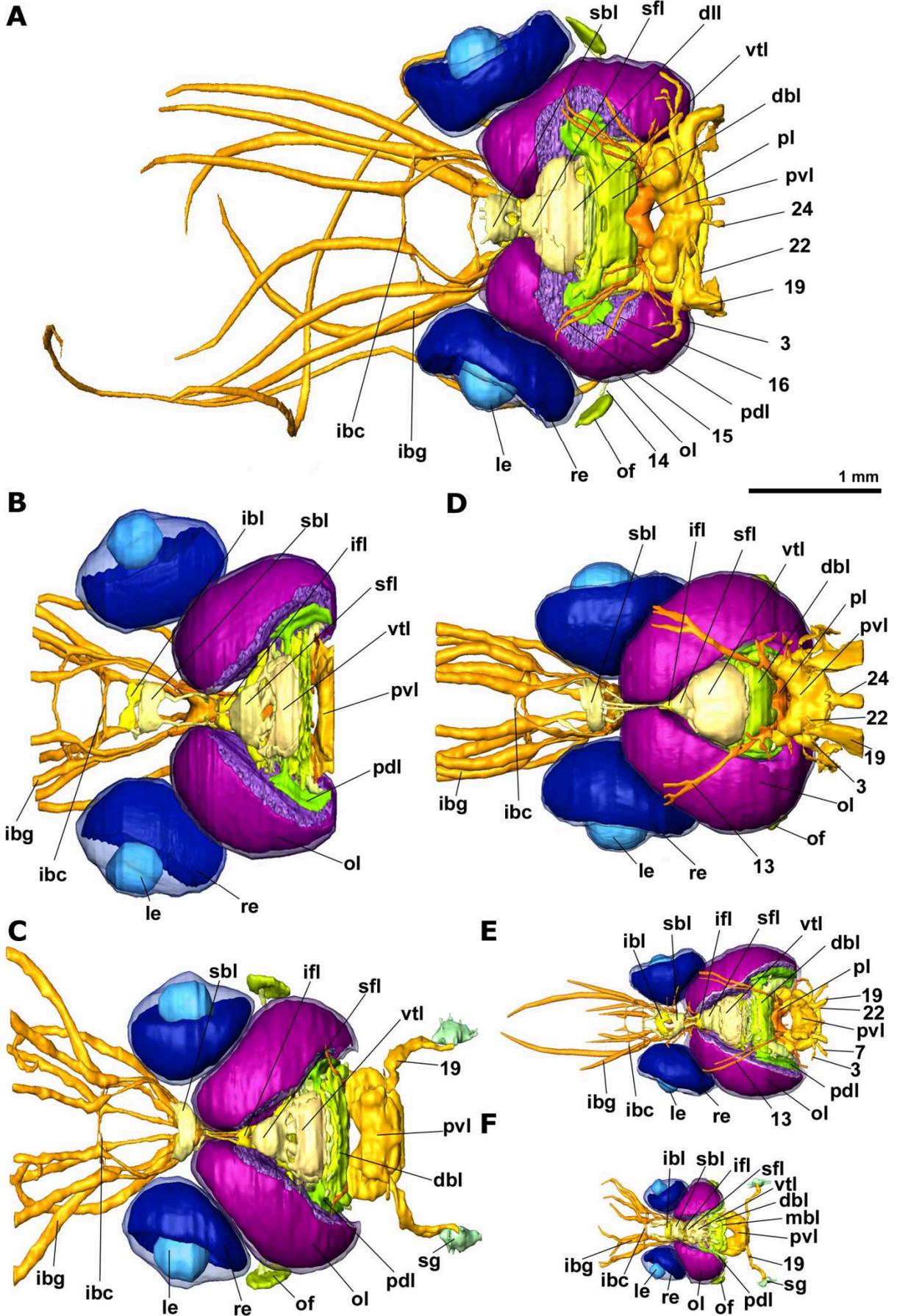
Die Augen (horizontaler Durchmesser 1150  $\mu\text{m}$ ) liegen mittig auf der virtuellen horizontalen Mittellinie durch den Kopf und blicken leicht nach vorne und oben. Am untersuchten Tier sind die Augen nicht verformt und in der Mitte der voluminösen vorderen Kammer aufgehängt (wie bei *S. officinalis*). Die vorderen Kammerorgane sind in diesem Stadium gut entwickelt. Die Retinae sind in Aufsicht ellipsoidal (horizontaler Durchmesser ca. 1025  $\mu\text{m}$ , vertikaler Durchmesser ca. 715  $\mu\text{m}$ , Abb. 13B) mit gleichmäßiger Krümmung und Dicke, wobei die Photorezeptoren vergleichsweise kurze distale Segmente besitzen, wohingegen die Kernregion der Stützzellen einen größeren Raum einnimmt (Abb. 14B). Durch den voluminösen Glaskörper entsteht ein ziemlich großer Abstand zwischen Linse und Retina. Die Linse (Durchmesser 425  $\mu\text{m}$ , distales Segment 21%) ist aufgrund eines Präparationsartefakts am Septum auseinandergebrochen, was die Verbindungen des Ziliarkörpers zum jeweils distalen und proximalen Anteil hervorhebt (Abb. 13B). Der dünne ventrale Anteil der optischen Kommissur verläuft direkt über den kaum sichtbaren Oesophagus, unter dem noch der Dottersack liegt (Abb. 16B). Die Pedunkelkommissur erkennt man nur bei ihrem Eintritt in den rechten Pedunkellobus.

---

**Abbildung 12: 3D-Rekonstruktion der Augen und des Zentralnervensystems: sub- und supraoesophageale Masse, optische Loben und Armnerven (vergleichende dorsale Ansichten, A-F gleicher Maßstab).** ►

**A:** *Sepia officinalis*, **B:** *Rossia macrosoma*, **C:** *Sepietta obscura*, **D:** *Idiosepius notoides*, **E:** *Loligo vulgaris*, **F:** *Octopus vulgaris*.

**3:** Nervus collaris, **7:** Nervus infundibuli posterior, **13:** Nervus oculomotorius posterior superior, **14:** Nervus olfactorius, **15:** Nervus ophthalmicus superior anterior, **16:** Nervus ophthalmicus superior posterior, **19:** Nervus pallialis, **22:** Nervus retractor capitis posterior, **24:** Nervus visceralis, **dbl:** dorsaler Basallobus, **dll:** Dorsolaterallobus, **ibc:** Interbrachialkommissur, **ibg:** Intrabrachialganglion, **ibl:** unterer Buccallobus, **ifl:** unterer Frontallobus, **le:** Linse, **mbi:** mittlerer Basallobus, **of:** Geruchsorgan, **ol:** optischer Lobus (purpur = äußere plexiforme Schicht, violett = Medullaneuropile; aufgrund der schlechten Strukturhaltung in *I. notoides* nicht rekonstruiert), **pdl:** Pedunkellobus, **pl:** Pedallobus, **pvl:** Pallioviscerallobus, **re:** Retina, **sbl:** oberer Buccallobus, **sfl:** oberer Frontallobus, **vtl:** Vertikallobus.



Der Transversalschnitt durch die Brachiopedalkonnektive zeigt wie bei *S. officinalis* einen großen Kernbereich durch den die einzelnen Konnektive als Nervenstränge verlaufen. Da Brachial- und Pedallobus bei *R. macrosoma* weiter auseinander gelegen sind, weisen die Brachiopedalkonnektive eine größere Länge auf als bei *S. officinalis* (zweimal so lang: Abb. 20B). Die in den Pedalloben entspringenden vorderen Augenmuskelnerven folgen den Brachiopedalkonnektiven nur ein kurzes Stück, biegen schon weit posterior nach ventral ab und konnten danach nicht mehr verfolgt werden.

Bei *R. macrosoma* liegen die Buccal- und Frontalloben deutlich weiter voneinander und vom Brachiallobus entfernt (Abb. 18B) als bei *S. officinalis*. Dabei liegen die Buccalloben besonders weit vor dem Brachiallobus, wodurch die Buccobrachialkonnektive auffallend lang ausgebildet sind. Auch die Cerebrobrachialkonnektive sind verlängert, aber nicht im selben Ausmaß wie die Buccobrachialkonnektive. Cerebrobuccalkonnektive waren in Ansätzen sichtbar, konnten aber nicht weiter verfolgt werden. Eine Verbindung zwischen dem oberen Buccallobus und dem unteren Buccallobus im Sinne eines Interbuccalkonnektivs konnte am vorliegenden Material nicht entdeckt werden.

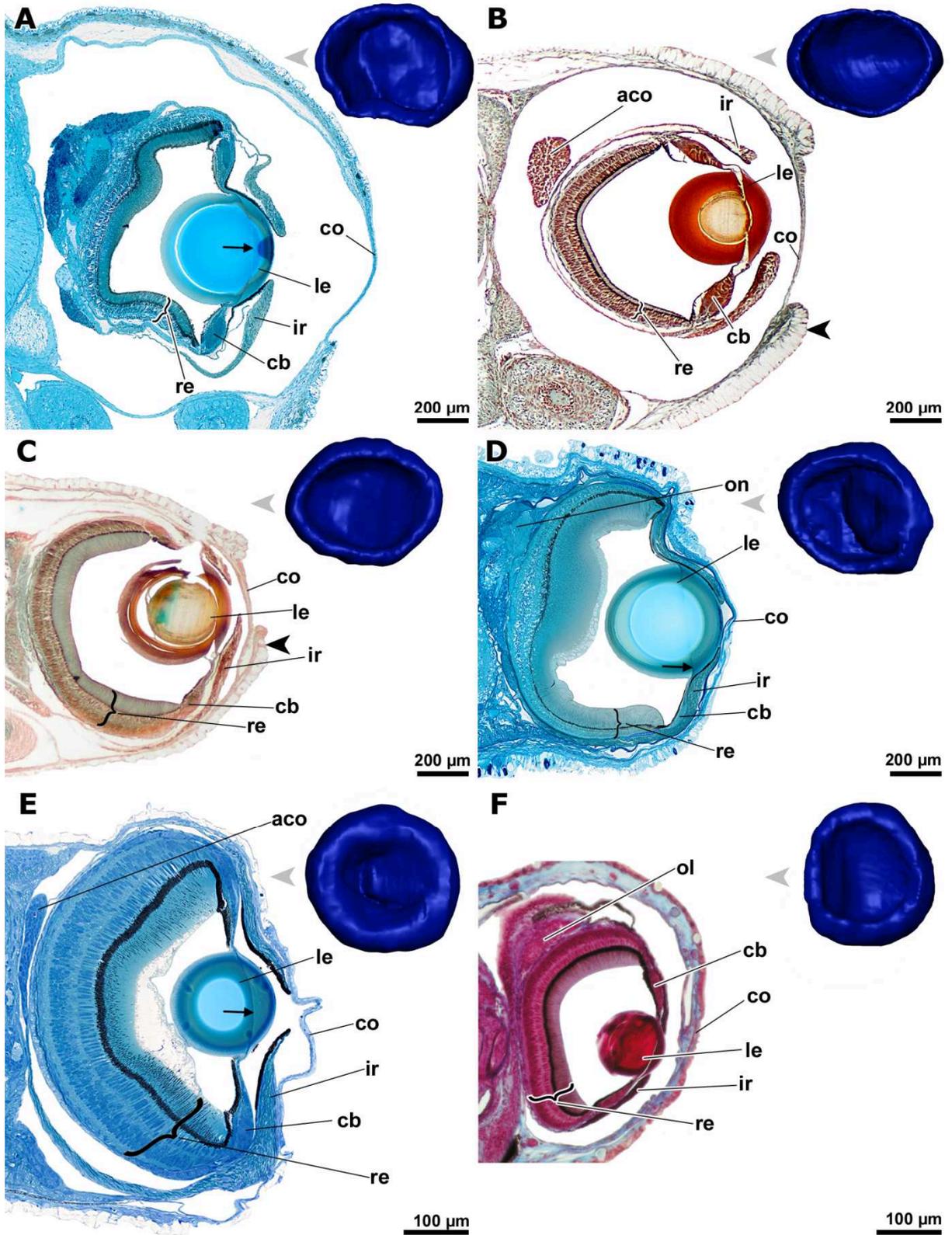
Die Statocysten sind gut erhalten und vergleichsweise von geringer Größe in Bezug auf das gesamte Kopfvolumen (der vertikale Durchmesser in den Transversalschnitten beträgt 590 µm, Abb. 7G+H). Die Geruchsorgane können als flache Anlagen erkannt werden und liegen ventro-lateral des hinteren Teils des vorderen Kammerorgans.

---

**Abbildung 13: Vergleichende Augenhistologie (Transversalschnitte durch die Mitte der Linsen mit Oberflächenmodellen der linken Retinae – nicht maßstabsgetreu; die graue Pfeilspitze zeigt nach rostral).** ►

**A:** *Sepia officinalis* (Richardson), **B:** *Rossia macrosoma* (Trichrome de Masson), **C:** *Sepietta obscura* (Trichrome de Masson), **D:** *Idiosepius notoides* (Richardson), **E:** *Loligo vulgaris* (Richardson), **F:** *Octopus vulgaris* (Azan).

**aco:** vorderes Kammerorgan, **cb:** Ziliarkörper, **co:** Cornea, **ir:** Iris, **le:** Linse, **ol:** optischer Lobus, **on:** optischer Nerv, **re:** Retina, **Pfeile:** Septum, **schwarze Pfeilspitzen:** Lider.

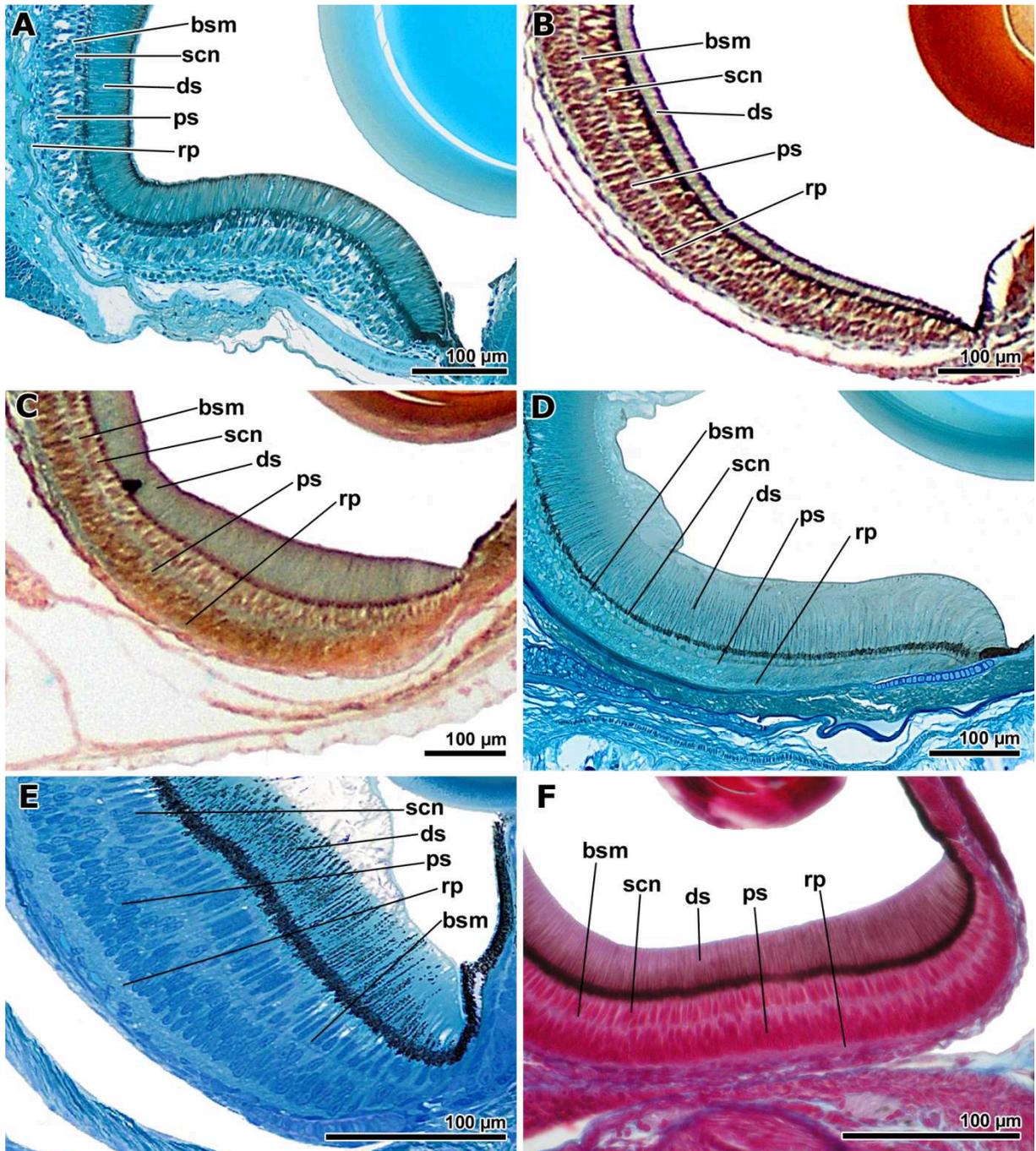


### 3.1.4 *Sepietta obscura*

Der Schlüpfling von *S. obscura* (horizontaler Kopfdurchmesser ca. 2,5 mm) hat einen schmalen Körper mit einer leichten dorso-ventralen Kompression im Bereich des Kopfes und der Armkrone. Er besitzt im Vergleich zu den acht Armen wesentlich dickere Tentakel, die ohne Schleife in ihrer Tentakeltasche liegen (Abb. 8B-D). Die von der Interbrachialkommissur verbundenen Armnerven wurden hingegen nicht bis in ihre äußersten Spitzen dargestellt. Die Augen sind auf der horizontalen Mittellinie des Kopfes zentriert und blicken nach lateral und leicht aufwärts (Abb. 12C). Die kugelförmigen Augenbulben (horizontaler Durchmesser 1000 µm) füllen die vordere Augenkammer im Mittelteil fast vollständig aus (außer im Bereich der Cornea). Die vorderen Kammerorgane sind nur schwach entwickelt und nur am hinteren Ende der Augen zu sehen (Abb. 8E). Die Cornea ist stark ausgebildet und wird nach ventral etwas dünner (Abb. 13C). Die Krümmung der Retina ist ebenmäßig mit einer leichten horizontalen Biegung, durch die eine kleinere ventrale und eine größere dorsale Retina“hälfte“ (mit etwas längeren distalen Photorezeptorsegmenten) bestimmt wird (Abb. 13C, 14C). Allgemein ist die Retina halbkugelig mit einer leichten Abflachung an der Kontaktstelle zum optischen Lobus. Der Glaskörper ist gut entwickelt, wie auch bei *S. officinalis* und *R. macrosoma*. Die Linse (Durchmesser 415 µm) hat ein vergleichsweise kleines distales Segment (15 % des Durchmessers) und aufgrund der Präparation haben sich einzelne Linsenplatten abgelöst.

Auf dem Transversalschnitt durch die Region der optischen Kommissur erkennt man gut den mittleren Teil der ventralen optischen Kommissur, die direkt über dem Oesophagus verläuft (Abb. 16C). Dorsal dazu liegt die Pedunkelkommissur, die man in ihrem kompletten Verlauf zwischen den beiden Pedunkelloben erkennen kann.

Die Buccal- und Frontalloben liegen wie bei *Rossia macrosoma* weit auseinander, wobei bei *S. obscura* der untere Frontallobus noch weiter vom Brachiallobus entfernt ist (Abb. 18C). Dadurch sind insbesondere die Cerebrobrachialkonnektive länger ausgebildet. Aufgrund des relativ geringeren Abstandes zwischen dem oberen Buccallobus und dem Brachiallobus sind die Buccobrachialkonnektive etwas kürzer als die Cerebrobrachialkonnektive. Cerebrobuccalkonnektive konnten nicht gefunden werden. Die Cerebrosubradularkonnektive entspringen im oberen Buccallobus und laufen lateral entlang des unteren Buccallobus. Sie konnten darüber hinaus aber nicht bis zum Subradularganglion verfolgt werden.



**Abbildung 14: Vergleichende Retinahistologie (ventraler Bereich, Transversalschnitte durch die Mitte der Linsen).**

**A:** *Sepia officinalis* (Richardson), **B:** *Rossia macrosoma* (Trichrome de Masson), **C:** *Sepietta obscura* (Trichrome de Masson), **D:** *Idiosepius notoides* (Richardson), **E:** *Loligo vulgaris* (Richardson), **F:** *Octopus vulgaris* (Azan).

**bsm:** Basalmembran, **ds:** distale Segmente der Photorezeptorzellen, **ps:** proximale Segmente der Photorezeptorzellen, **rp:** retinaler Plexus, **scn:** Zellkerne der Stützzellen.

Da auch bei *S. obscura* Brachial- und Pedallobus weit voneinander entfernt sind, müssen die Brachiopedalkonnektive lang sein (Abb. 20C). Außerdem liegen die optischen Loben bei *S. obscura* ventro-median sehr nahe beieinander, wodurch der Bereich der Brachiopedalkonnektive sehr schmal ist (Abb. 8E, 12C, 19C, 20C). Diese Nerven verlaufen dort wie zu einem Bündel zusammengefasst (Abb. 19C) und die Zellkerne sind nach dorsal und ventral verlagert. Die einzelnen Nervenstränge waren dadurch nur schwer zu unterscheiden und die oculomotorischen Nerven konnten nach ihrem Austritt aus den Pedalloben nur über eine kurze Strecke verfolgt werden. Von den Palliovisceralloben aus kann man aufgrund der weit nach posterior gehenden Schnittserie dem Pallialnerv bis zu seinem Zielort, dem Stellarganglion, folgen.

Die Statocysten (maximaler Durchmesser ca. 590  $\mu\text{m}$ ) zeigen Zeichen einer Schrumpfung, die dorso-ventrale Abflachung ist jedoch ursprünglich (Abb. 8G). Das Geruchsorgan ist ventro-lateral hinter den Augen gelegen und weist eine flache ovale Form auf (350 x 300 x 50  $\mu\text{m}^3$ , Abb. 8E, 12C).

---

**Abbildung 15: Vergleichende Histologie der optischen Loben mit den plexiformen Schichten (Transversalschnitte).** ►

**A:** *Sepia officinalis* (Richardson),

**B:** *Rossia macrosoma* (Azan),

**C:** *Sepietta obscura* (Azan),

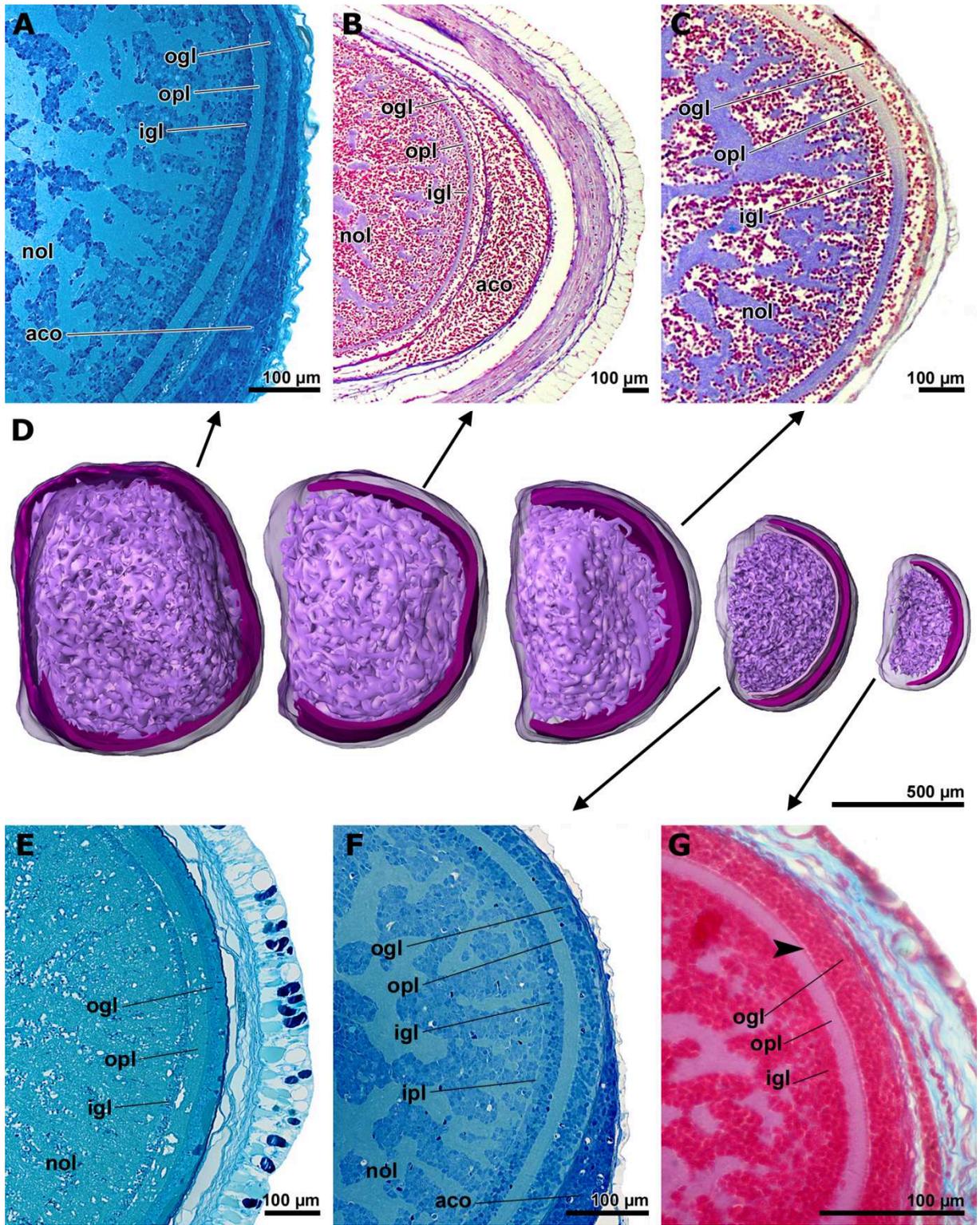
**D:** Oberflächenmodelle der schwammigen Medullaneuropile (violett) umgeben von den äußeren plexiformen Schichten (purpur, angeschnitten); bei *L. vulgaris* ist eine zusätzliche innere plexiforme Schicht (rosa) sichtbar; bei *I. notoides* wurden die Neuropile aufgrund schlechter Strukturerhaltung nicht rekonstruiert,

**E:** *Idiosepius notoides* (Richardson),

**F:** *Loligo vulgaris* (Richardson),

**G:** *Octopus vulgaris* (Azan).

**aco:** vorderes Kammerorgan, **igl:** innere Körnerschicht, **ipl:** innere plexiforme Schicht, **noI:** Neuropil der optischen Loben, **ogl:** äußere Körnerschicht, **opl:** äußere plexiforme Schicht.

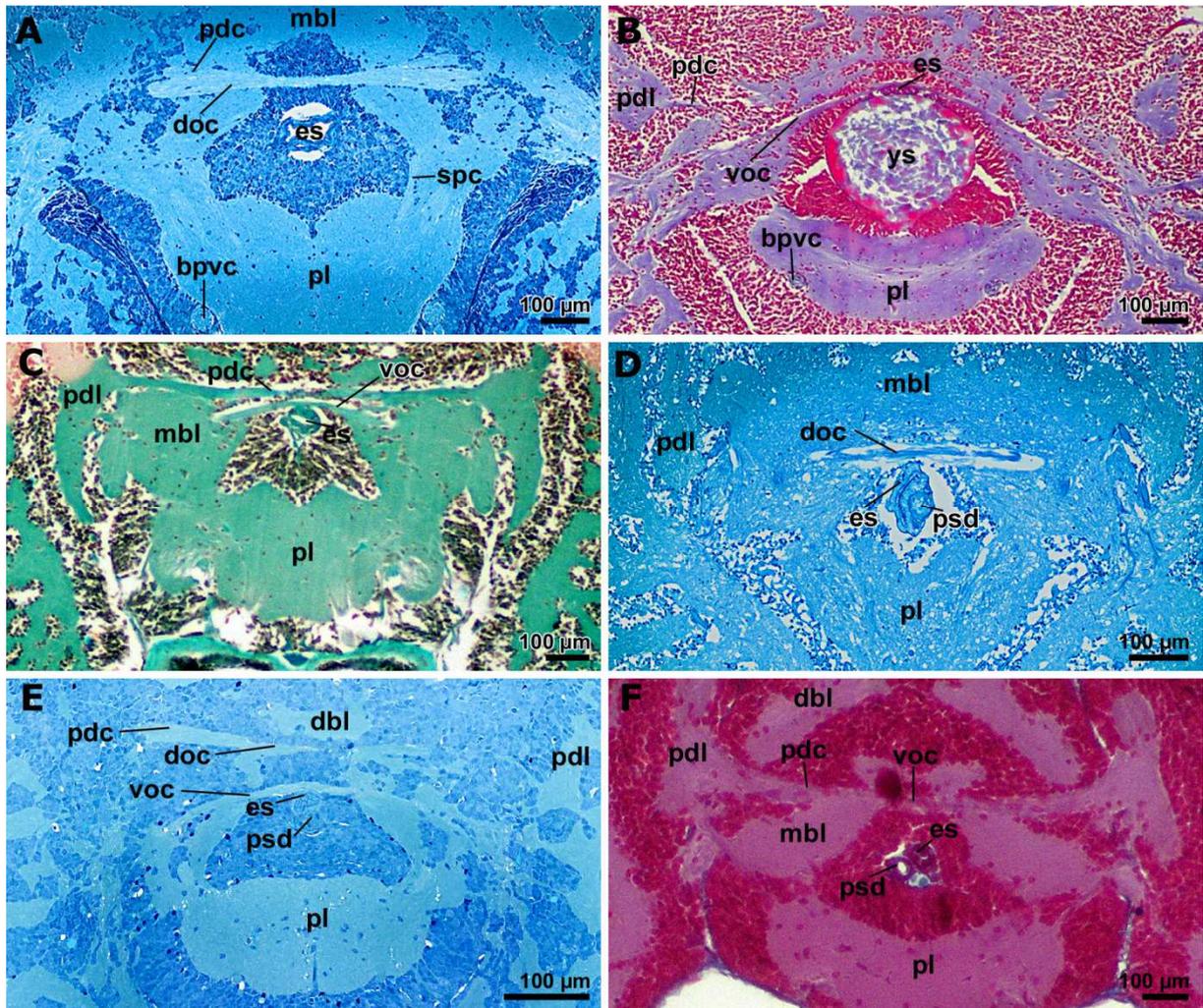


### 3.1.5 *Idiosepius notoides*

Das untersuchte Tier von *I. notoides* (post-hatchling Stadium!) besitzt eine Kopfreion, die ungefähr dieselbe Größe hat (horizontaler Kopfdurchmesser ca. 2,2 mm), wie bei *R. macrosoma* mit markanten optischen Loben und Augen (Abb. 12D). Das ZNS zeigt einen vergleichsweise kompakten Aufbau, d.h. die optischen Loben sind von der sub- und supraoesophagealen Masse weniger abgetrennt als bei den anderen Arten, die Magnocellularloben ragen lateral nicht so weit hervor und die supraoesophagealen Neuropile sind dichter gepackt. Die basale Armkrone ist ziemlich eng und die Intrabrachialganglien haben einen bemerkenswert großen Durchmesser (Abb. 9B, 12D).

Die Augen von *I. notoides* sind groß (horizontaler Durchmesser 1250  $\mu\text{m}$ ) und die vordere Kammer ist kaum auszumachen (Abb. 13D). Sie liegen eng beieinander und blicken genau in laterale Richtung (Abb. 12D). Die vorderen Kammerorgane sind nur schwach entwickelt. Die beiden Segmente der Linse (Gesamtdurchmesser 475  $\mu\text{m}$ ) haben unterschiedliche Krümmungsradien und verschiedene cortex-core-Proportionen (Abb. 13D). Der distale Bestandteil macht einen vergleichsweise großen Volumenanteil aus ( $> 30\%$ ) und der proximale Bestandteil ist in axialer Richtung leicht in die Länge gezogen. Die Glaskörper sind normal entwickelt, wohingegen die Ziliarkörper bei dieser Art nur schwach ausgeprägt sind. Die Retina ist in der Mitte verdickt und die Spitzen der Photorezeptoren zeigen in der zentralen und dorsalen Retina artifizielle Anschwellungen. Die ventrale Retina ist abgeflacht und vereinigt sich mit der dorso-nasalen Retina nahtlos, von der zentro-temporalen Retina ist sie jedoch durch einen deutlichen Knick abgesetzt. Letztere wird durch die optischen Loben zu einer hufeisenförmigen Verdickung und einer leichten temporalen/horizontalen Vertiefung hervorgesoben. Wie auch bei *S. officinalis* dünnt das dunkle retinale Pigment in den zentralen bis ventralen Bereichen der Retina aus (Abb. 13D).

Die optischen Loben sind voluminös und nähern sich frontal und fronto-ventral stark einander an. Ihre innere Struktur ist regulär, d.h. mit äußerer Körnerschicht, äußerer plexiformer Schicht, innerer Körnerschicht und Medulla, die aus Neuropil und Zellinseln besteht. Das Neuropil der Medulla ist am untersuchten Tier jedoch wegen des schlechten Erhaltungszustands nur schwer von den Zellkerninseln zu unterscheiden (Abb. 9E-G, 15D), weswegen hier auf eine 3D-Rekonstruktion verzichtet wurde. Diese Schwierigkeiten zeigen



**Abbildung 16: Vergleichende Histologie des Zentralnervensystems I (Transversalschnitte auf Höhe der optischen Kommissur).**

**A:** *Sepia officinalis* (Richardson), **B:** *Rossia macrosoma* (Azan), **C:** *Sepietta obscura* (Trichrome de Masson), **D:** *Idiosepius notoides* (Richardson), **E:** *Loligo vulgaris* (Richardson), **F:** *Octopus vulgaris* (Azan).

**bpvc:** Brachiopalliovisceralkonnektiv, **dbl:** dorsaler Basallobus, **doc:** dorsale optische Kommissur, **es:** Oesophagus, **mbl:** mittlerer Basallobus, **pdc:** Pedunkelkommissur, **pdl:** Pedunkellobus, **pl:** Pedallobus, **psd:** hinterer Speicheldrüsengang, **spc:** Suprapedalkommissur, **voc:** ventrale optische Kommissur, **ys:** Dottersack.

sich auch im Bereich der optischen Kommissur, wo ein quer durch das Neuropil des medianen Basallobus verlaufendes Faserbündel gesehen werden kann, das der dorsalen optischen Kommissur zugewiesen wurde (Abb. 9F, 16D). Die Cerebrobuccalkonnektive verlaufen aufgrund der anterior und ventral eng zusammenliegenden optischen Loben nah beieinander und konnten vor ihrem Eintritt in den unteren Frontallobus nur noch als ein einzelner Strang dargestellt werden (Abb. 18D). Auch die Brachiopedalkonnektive sind wegen

der Lage der optischen Loben so nah aneinander gerückt, dass sie nur schwer zu identifizieren waren (Abb. 19D) und nur noch als eine Einheit dargestellt werden konnten (Abb. 20D). Kernbereiche können hier zwischen den einzelnen Konnektiven überhaupt nicht ausgemacht werden. Die oberen Antorbitalnerven verlaufen als sehr dünne Stränge am weitesten dorsal zwischen den optischen Loben. Da der Brachial- und der Pedallobus weit auseinander liegen, sind auch hier die Brachiopedalkonnektive ziemlich lang. Die Brachio-palliovisceralkonnektive verlaufen an der ventralen Seite dieses Komplexes. Die vorderen unteren Augenmuskelnerven können erst an ihrer Abzweigung nach latero-ventral als eigenständige Nerven identifiziert werden.

Bei *I. notoides* liegen die Frontalloben wie schon bei *S. obscura* deutlich weiter vom Brachiallobus entfernt als bei *S. officinalis*, weshalb die Cerebrobrachialkonnektive auffallend lang sind (Abb. 18D). Spezifische Merkmale der suboesophagealen Masse sind (1) ein „Plexus“ der vorderen Trichternerven, der ventral des Pedallobus gelegen ist, (2) die Anwesenheit eines mittleren Trichternervs und (3) der parallele Verlauf der posterioren okulomotorischen und ophthalmischen Nerven.

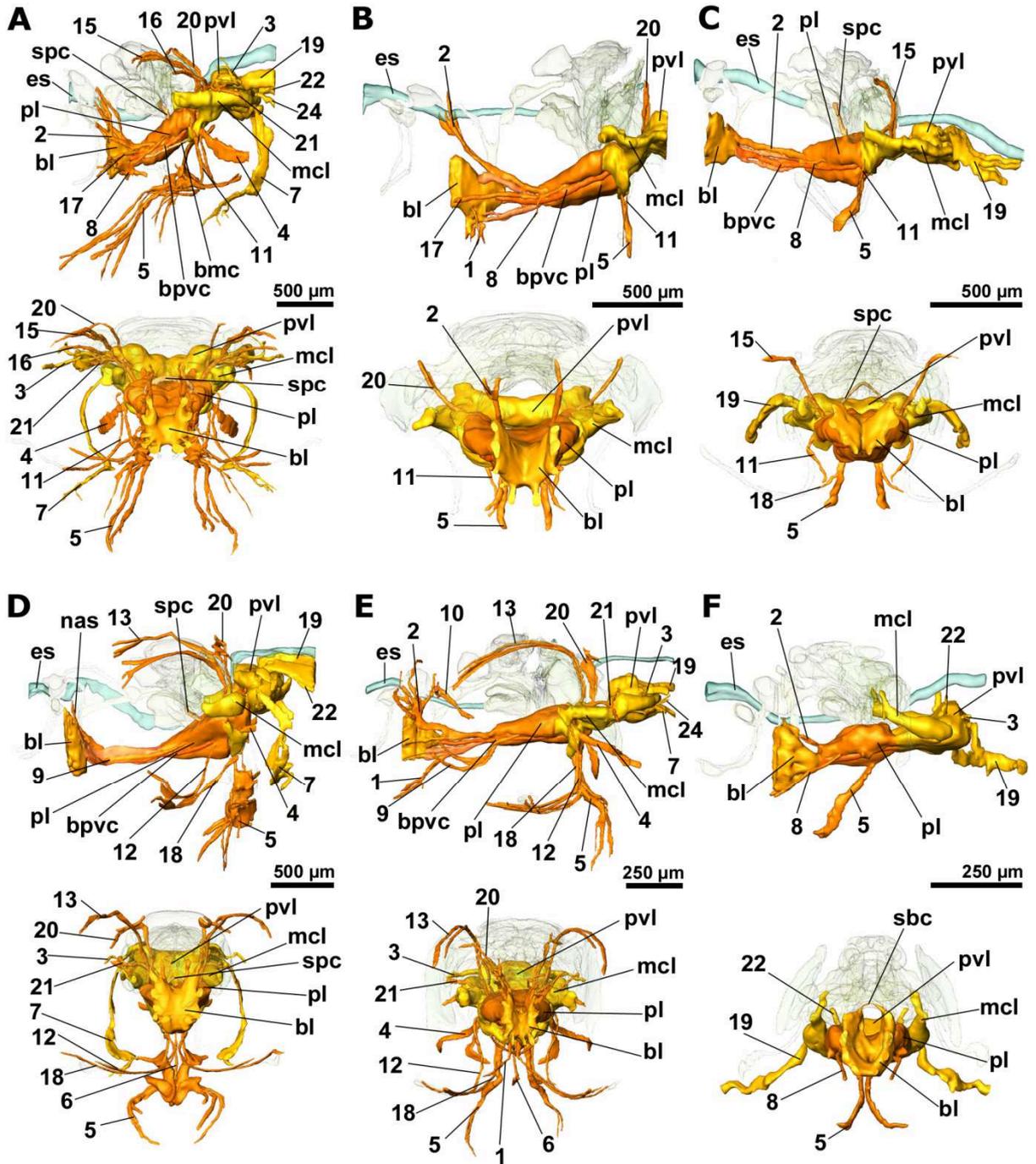
Die Statocysten sind bei *I. notoides* große Organe (maximaler Durchmesser in Transversalschnitten 790  $\mu\text{m}$ ), die von den Palliovisceralloben fronto-dorsal verdrängt werden (Abb 9G+H). Die olfaktorischen Organe sind runde, schalenförmige Strukturen (270 x 270 x 110  $\mu\text{m}^3$ ), die erst weit hinter den Augen und latero-ventral der optischen Loben liegen (Abb. 9F, 12D).

---

**Abbildung 17: 3D-Rekonstruktion des Zentralnervensystems: Suboesophageale Neuropile (vergleichende links laterale und frontale Ansichten; A-F verschiedene Maßstäbe).** ►

**A:** *Sepia officinalis*, **B:** *Rossia macrosoma*, **C:** *Sepietta obscura*, **D:** *Idiosepius notoides*, **E:** *Loligo vulgaris*, **F:** *Octopus vulgaris*.

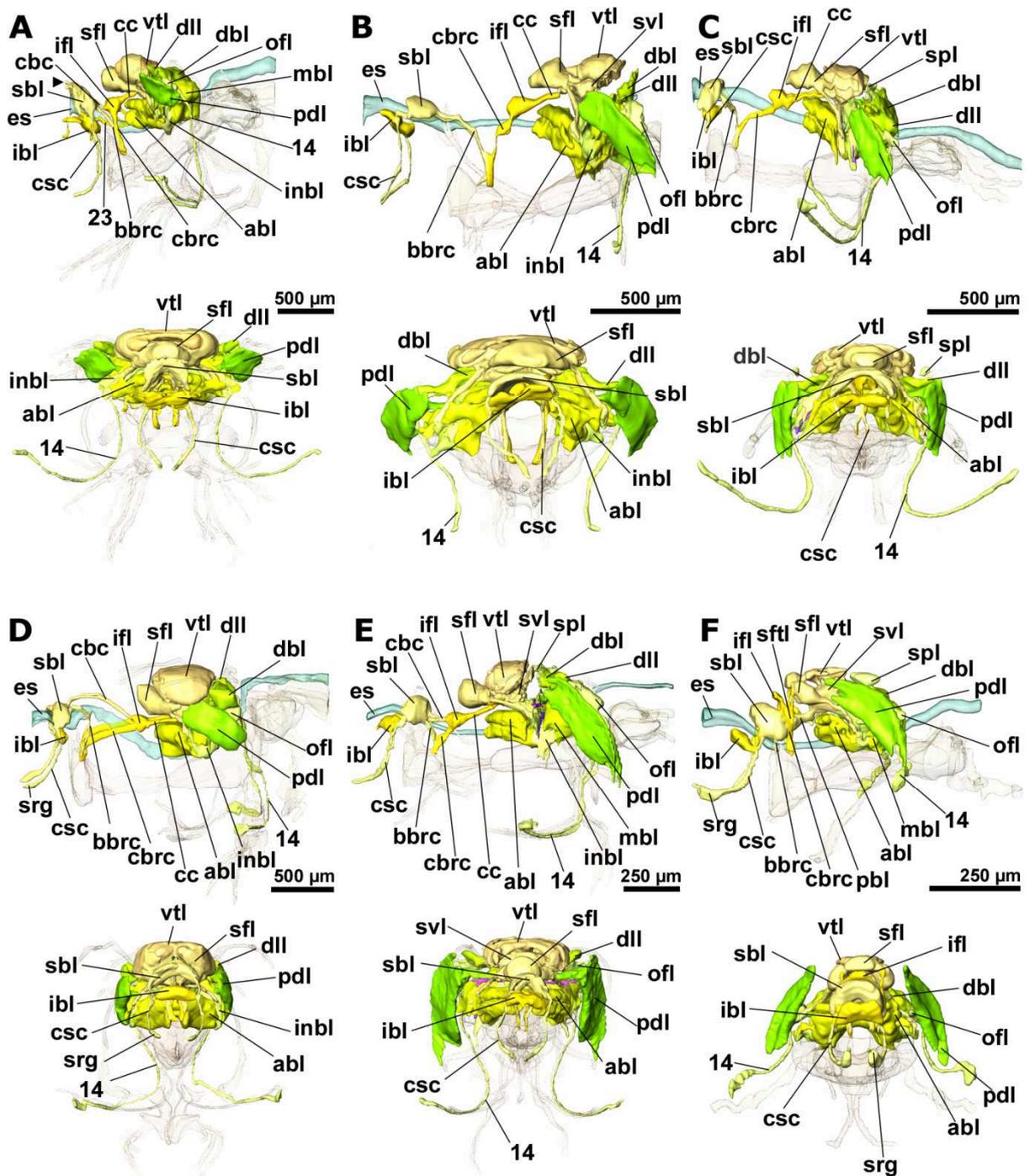
**1:** Nervus antorbitalis inferior, **2:** Nervus antorbitalis superior, **3:** Nervus collaris, **4:** Nervus cristae staticae, **5:** Nervus infundibuli anterior, **6:** Nervus infundibuli medianus, **7:** Nervus infundibuli posterior, **8:** Nervus oculomotorius anterior, **9:** Nervus oculomotorius anterior inferior, **10:** Nervus oculomotorius anterior superior, **11:** Nervus oculomotorius posterior, **12:** Nervus oculomotorius posterior inferior, **13:** Nervus oculomotorius posterior superior, **15:** Nervus ophthalmicus anterior superior, **16:** Nervus ophthalmicus posterior superior, **17:** Nervus ophthalmicus anterior inferior, **18:** Nervus ophthalmicus posterior inferior, **19:** Nervus pallialis, **20:** Nervus postorbitalis, **21:** Nervus retractor capitis anterior, **22:** Nervus retractor capitis posterior, **24:** Nervus visceralis, **bl:** Brachiallobus, **bmc:** Brachiomagnocellularkonnektiv, **bpvc:** Brachiopalliovisceralkonnektiv, **es:** Oesophagus, **mcl:** Magnocellularlobus, **pl:** Pedallobus, **pvl:** Pallioviscerallobus **sb:** Suprabrachialkommissur, **spc:** Suprapedalkommissur.



### 3.1.6 *Loligo vulgaris*

Der Schlüpfling von *L. vulgaris* ist der kleinste der fünf in dieser Arbeit untersuchten Arten der Decabrachia (horizontaler Kopfdurchmesser ca. 1,1 mm). Das erste Armpaar ist im Vergleich zu den anderen gerade erst sichtbar, folglich sind die ventralen Armnerven und ihre Intrabrachialganglien weiter entwickelt als die weiter dorsal gelegenen (Abb. 10B+C). Die beiden Tentakel sind vergleichsweise am stärksten ausgeprägt und ihre Nerven überragen die Armnerven (Abb. 12E).

Die Augen (horizontaler Durchmesser 615  $\mu\text{m}$ ) füllen den vorderen Kopfbereich zu einem vergleichsweise hohen Prozentsatz aus, wodurch die vorderen Kammern nur sehr schmal sind (Abb. 13E). Das vordere Kammerorgan ist torusförmig (mit dreieckigem Profil) und füllt den Bereich zwischen den Augen und den optischen Loben aus, wobei es sich ventro-lateral weiter entlang der äußeren Oberfläche des optischen Lobus erstreckt. Ventral verläuft der untere ophthalmische Nerv teilweise durch das vordere Kammerorgan, dorsal hat es eine Einschnürung für die Augenmuskeln. Die Augen blicken in einer horizontalen Ebene leicht nach vorne und befinden sich in der Mitte recht nahe beieinander, so dass für den Buccalbereich nur wenig Raum bleibt (Abb. 12E). Die zusammengesetzte Linse (Durchmesser 180  $\mu\text{m}$ , das distale Segment nimmt 15% ein) ist in einen vergleichsweise schmalen Glaskörper eingebettet (Abb. 13E). Die Retina ist gut entwickelt mit einer hohen Photorezeptordichte, die man an der dicken Schicht der Photorezeptorkerne und dem auffällig stark entwickelten retinalen Plexus abschätzen kann. Sie besitzt außerdem eine außergewöhnlich dunkle Pigmentschicht, auch zwischen den distalen Segmenten und entlang der Innenseiten des Ziliarkörpers und der Iris (Abb. 13E, 14E). Die Retina ist ziemlich dick (max. 160  $\mu\text{m}$ ), besonders im Vergleich mit dem Augendurchmesser, in der frontalen Hälfte halbkugelförmig und in der temporalen Hälfte eine abgeflachte Rampe bildend (Abb. 13E). Wie bei *S. officinalis* und *R. macrosoma*, aber gegensätzlich zu *S. obscura* und *I. notoides*, werden die optischen Loben frontal durch den Brachiallobus und die unteren Frontalloben auseinander gehalten. Fronto-lateral werden sie durch die Augenbecher ganz leicht abgeflacht. Im Cortex kann man deutlich eine dünne innere plexiforme Schicht sehen, die sich an die innere Körnerschicht anschließt (Abb. 10F, 15F). Bei *L. vulgaris* sind die quer verlaufenden Kommissuren, die zwischen den Hirnhälften vermitteln, gut zu unterscheiden (Abb. 16E). Genau über den Oesophagus verläuft der ventrale Anteil der optischen



**Abbildung 18: 3D-Rekonstruktion des Zentralnervensystems: Supraesophageale Neuropile (vergleichende links laterale und frontale Ansichten; A-F verschiedene Maßstäbe).**

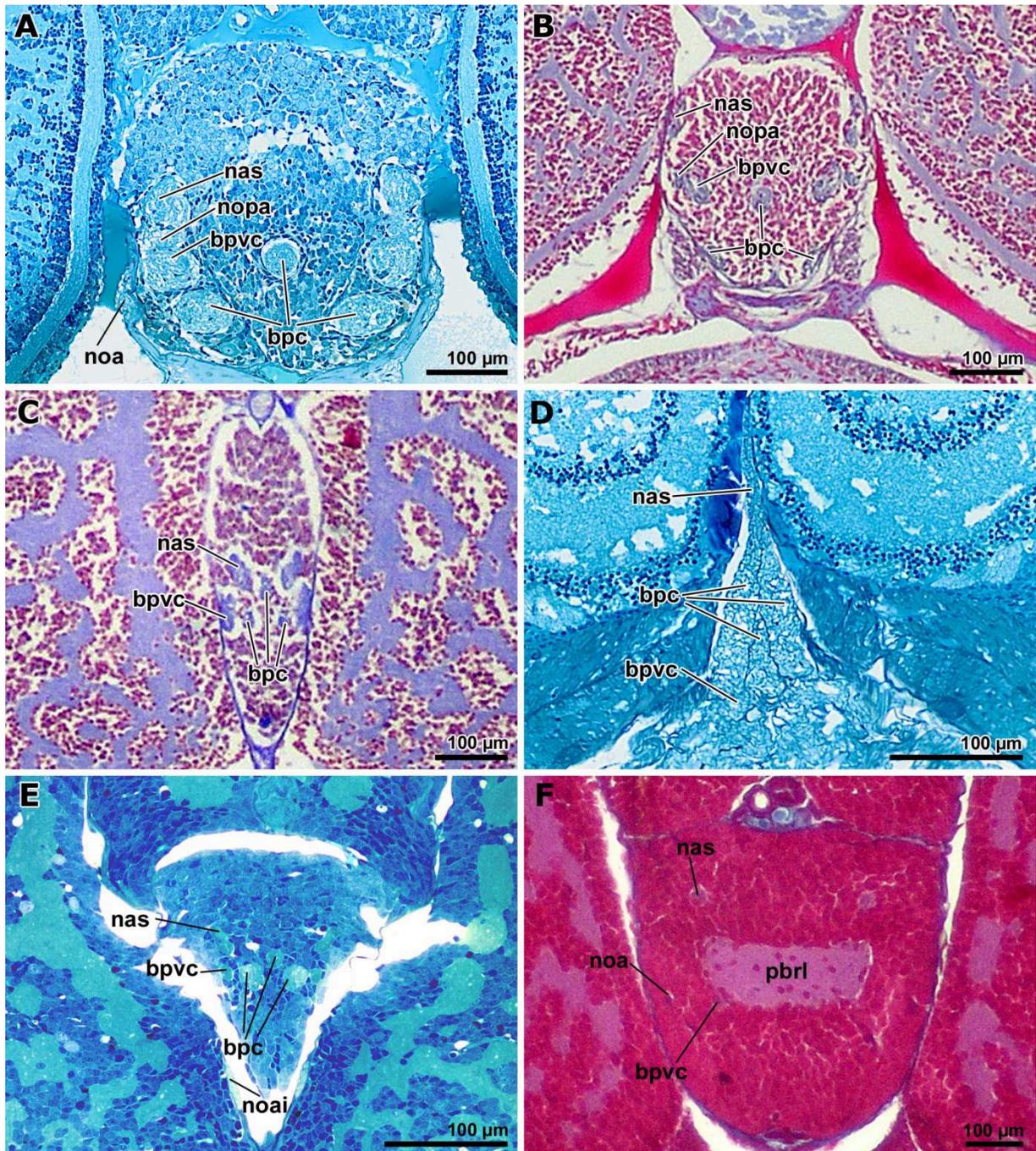
**A:** *Sepia officinalis*, **B:** *Rossia macrosoma*, **C:** *Sepietta obscura*, **D:** *Idiosepius notoides*, **E:** *Loligo vulgaris*, **F:** *Octopus vulgaris*.

**14:** Nervus olfactorius, **23:** Nervus sympathicus, **abl:** vorderer Basallobus, **bbr:** Buccobranchial-konnektiv, **cbc:** Cerebrobuccalkonnektiv, **cbrc:** Cerebrobranchialkonnektiv, **cc:** Cerebralkonnektiv, **csc:** Cerebrosubradularkonnektiv, **dbl:** dorsaler Basallobus, **dll:** Dorsolaterallobus, **es:** Oesophagus, **ibl:** unterer Buccallobus, **ifl:** unterer Frontallobus, **inbl:** Interbasallobus, **mbl:** mittlerer Basallobus, **ofl:** olfaktorischer Lobus, **pbl:** hinterer Buccallobus, **pdl:** Pedunkellobus, **sbl:** oberer Buccallobus, **sfl:** oberer Frontallobus, **sfl:** Subfrontallobus, **spl:** subpedunkulater Lobus, **srg:** Subradularganglion, **svl:** Subvertikallobus, **vtl:** Vertikallobus.

Kommissur. Der dorsale Anteil liegt etwas oberhalb, woran sich wiederum die Pedunkelkommissur direkt anschließt. Aufgrund der medio-ventral relativ eng aneinander liegenden optischen Loben sind die Brachipedalkonnektive in ihrer lateralen Ausdehnung eingeschränkt (Abb. 10E, 19E, 20E). So findet man die Kerngebiete vor allem dorsal der Nervenstränge. Besonders auffällig sind die vorderen unteren Augenmuskelnerven, die nach ihrem Austritt aus dem Pedallobus von den Brachipedalkonnektiven abzweigen, dann an den Innenseiten der optischen Loben verlaufen und sich in einen ventralen und einen dorsalen Ast aufteilen (Abb. 17E, 20E). Es wurde in der vorderen suboesophagealen Masse nicht nach Präbrachial- und Brachiallobus unterschieden, wie es bei Young zu finden ist (1976b), entsprechendes gilt für die mittlere suboesophageale Masse (Pedalloben). Bei der hinteren suboesophagealen Masse (Palliovisceralloben) kann man unter anderem auffallende, dorso-lateral gelegene Loben (Flossen- und Chromatophorenloben) gut erkennen (Abb. 17E). Auch sieht man die Überkreuzung der Axone der beiden Riesennervenzellen erster Ordnung (Abb. 10H: ►).

Da die Buccal- und Frontalloben nahe beieinander und beide auch nahe am Brachiallobus liegen, sind die Cerebrobuccal- und Cerebrobrachialkonnektive sehr kurz (Abb. 18E). Besonders gut zu erkennen sind außerdem die auffallend kurzen Buccobrachialkonnektive. Auf den Transversalschnitten durch den Schlüpfling erkennt man gut markante Teile des Nervensystems (Abb. 10E-H). So sieht man deutlich wie sich das Neuropil des Vertikallobus dorsal über das Neuropil des Subvertikallobus erstreckt (Abb. 10E). Weiter ventral gelegen befindet sich der vordere Basallobus, der durch ein dünnes Band von Zellen (Abb. 10E: →) deutlich in einen vorderen (ventral gelegenen) und hinteren (dorsal gelegenen) Bereich unterteilt wird.

Wie auch bei den anderen untersuchten Arten der Decabrachia erscheint die Form der Statocysten (Durchmesser 425  $\mu\text{m}$ ) aufgrund geringer Gewebeschrumpfung etwas unregelmäßig (Abb. 10G+H) und die Statolithen befinden sich im frontalen Bereich. Die olfaktorischen Organe ( $275 \times 165 \times 40 \mu\text{m}^3$ ) liegen an beiden Seiten ventro-lateral der optischen Loben deutlich hinter den Augen (Abb. 10F).



**Abbildung 19: Vergleichende Histologie des Zentralnervensystems II (Transversalschnitte auf Höhe der Brachiopedalkonnektive).**

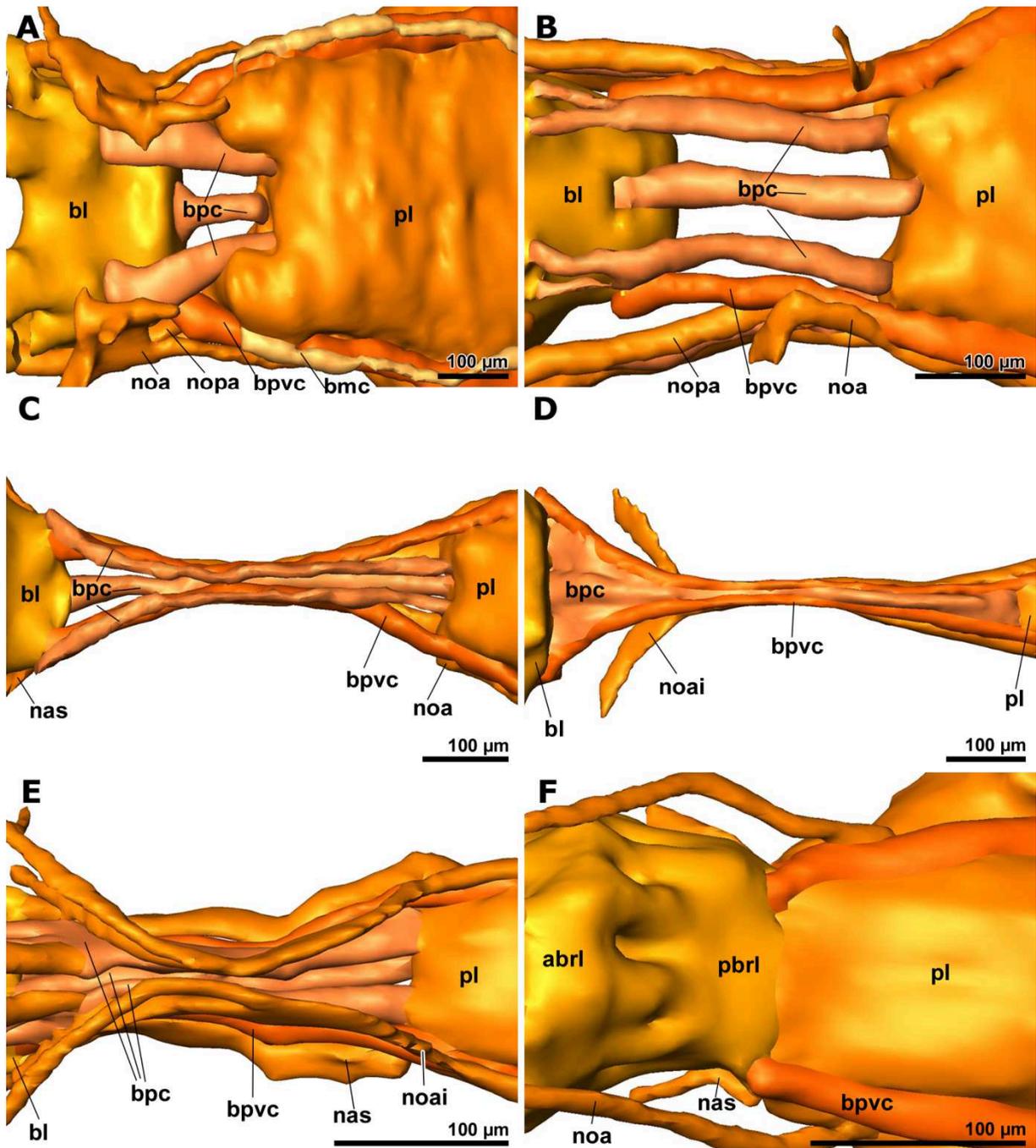
**A:** *Sepia officinalis* (Richardson), **B:** *Rossia macrosoma* (Azan), **C:** *Sepietta obscura* (Azan), **D:** *Idiosepius notoides* (Richardson), **E:** *Loligo vulgaris* (Richardson), **F:** *Octopus vulgaris* (Azan).

**bpc:** Brachiopedalkonnektiv, **bpvc:** Brachiopalliovisceralkonnektiv, **nas:** Nervus antorbitalis superior, **noa:** Nervus oculomotorius anterior, **noai:** Nervus oculomotorius anterior inferior, **nopa:** Nervus ophthalmicus anterior, **pbri:** hinterer Brachiallobus.

### 3.1.7 *Octopus vulgaris*

*O. vulgaris* ist der einzige in dieser Arbeit untersuchte Vertreter der Octobranchia und besitzt den kleinsten Schlüpfling (horizontaler Kopfdurchmesser ca. 0,75 mm). Eine Krone von acht kurzen Armen (alle ungefähr 550 – 650 µm lang) umgibt den Rest des äußeren Dottersacks (Abb. 11B). Die Mikroanatomie des peripheren Nervensystems der Arme ist mit der der Decabranchia vergleichbar, mit dem Unterschied, dass bei *O. vulgaris* keine Tentakel vorhanden sind. Das Integument wird durch zahlreiche, winzige „Stachel“ (Köllikersche Büschel) charakterisiert, die im Bereich der Cornea weniger dicht gepackt auftreten (Abb. 13F). Bei *O. vulgaris* blicken die Augen in einer horizontalen Ebene 45° nach vorne (Abb. 12F), liegen in einer gut erkennbaren vorderen Kammer und werden von einer relativ dicken Cornea begrenzt (23 µm; Abb. 11C+D, 13F). Falls vorhanden, sind die vorderen Kammerorgane unterentwickelt. Die Linse (Durchmesser 120 µm, distales Segment ca. 28%) hat einen vergleichsweise kleinen Cortex und der Glaskörper hat ein durchschnittliches Erscheinungsbild (Abb. 13F). Die Retina ist voll entwickelt und besitzt eine auffallende, dunkle Pigmentschicht (Abb. 13F, 14F). In der 3D-Ansicht sieht man die halbkuglige Form, die rostral leicht abgeflacht ist (Abb. 13F). Die optischen Loben werden wie bei *S. officinalis* von den vorderen Loben des ZNS auf Abstand gehalten (Abb. 12F). Frontal werden sie von den Augen stark eingedrückt, so dass sie eine leicht konkave Form annehmen (die Augen werden bei dieser Art bzw. in diesem Entwicklungsstadium nicht von den optischen Loben verformt). Am histologischen Schnittbild sieht man im optischen Lobus in der äußeren plexiformen Schicht bereits bei lichtmikroskopischer Auflösung den ersten Verschaltungshorizont der Photorezeptoren als dünne dunkler gefärbte Schicht (Abb. 15F: ►). Von der optischen Kommissur kann man nur median den ventralen Anteil über dem Oesophagus erkennen (Abb. 11F, 16F). Seitlich sieht man die von den beiden Pedunkelloben ausgehende Pedunkelkommissur.

Bei *O. vulgaris* gibt es keine sichtbaren Brachiopedalkonnektive, da das Neuropil des hinteren Brachiallobus kontinuierlich in das Neuropil des Pedallobus übergeht (Abb. 19F, 20F). Die Brachiopalliovisceralkonnektive entspringen im Brachiallobus und laufen am Pedallobus entlang zum Pallioviscerallobus. Vom Pedallobus kommend konnten zwei Nervenpaare identifiziert werden: die vorderen Augenmuskelnerven und die oberen Antorbitalnerven. Als Besonderheit der Octopodiformes konnte das Suprabrachialkonnektiv gefunden werden, das



**Abbildung 20: 3D-Rekonstruktion der anterioren suboesophagealen Masse (vergleichende Ventralansichten).**

**A:** *Sepia officinalis*, **B:** *Rossia macrosoma*, **C:** *Sepietta obscura*, **D:** *Idiosepius notoides*, **E:** *Loligo vulgaris*, **F:** *Octopus vulgaris*.

**abrl:** vorderer Brachiallobus, **bl:** Brachiallobus, **bmc:** Brachiomagnocellulararkonnektiv, **bpc:** Brachio-pedalkonnektiv, **bpvc:** Brachiopalliovisceralkonnektiv, **nas:** Nervus antorbitalis superior, **noa:** Nervus oculomotorius anterior, **noai:** Nervus oculomotorius anterior inferior, **nopa:** Nervus ophthalmicus anterior inferior, **pbri:** hinterer Brachiallobus, **pl:** Pedallobus.

die beiden Hälften des hufeisenförmigen anterioren Brachiallobus über den Oesophagus hinweg verbindet (Abb. 17F). Die hinteren Kopfretraktornerven führen bei *O. vulgaris* im Gegensatz zu denen der untersuchten Decabrachia nach oben anstatt nach hinten. Die dorsalen Bereiche der Magnocellularloben sind von den Palliovisceralloben getrennt. Da hier das gesamte Tier als Schnittserie vorlag, konnten auch die Stellarganglien dargestellt werden, die durch die Pallialnerven, die in den Palliovisceralloben entspringen, innerviert werden (Abb. 11H).

Die Buccal-, Frontal- und Brachialloben liegen bei *O. vulgaris* besonders nahe beieinander (Abb. 18F). Dadurch sind die dazugehörigen Konnektive auch sehr kurz. Da die Neuropile des oberen Buccallobus in die des hinteren Buccallobus übergehen und hier auch die Bahnen zum unteren Frontallobus verlaufen, gibt es keine sichtbaren Cerebrobuccalkonnektive. Der hintere Buccallobus liegt unter dem unteren Frontallobus und ist direkt mit den Subvertikalloben verbunden. Somit könnte er dem unteren Frontallobus der Decabrachia entsprechen, da jener dort über den Cerebraltrakt mit den Subvertikalloben verbunden ist. Die Cerebrobrachialkonnektive verlaufen vom Brachiallobus kommend am unteren Frontallobus entlang bis zum oberen Frontallobus. Die Cerebrosubradularkonnektive verlaufen am posterioren Ende des unteren Buccallobus vorbei zu den Subradularganglien und liegen dabei direkt hinter dem Interbuccalkonnektiv. Eine Subradularkommissur, wie von Marquis (1989) beschrieben, konnte jedoch nicht gefunden werden. Die Unterteilung der oberen Frontalloben in mediane und laterale Komponenten kann gut erkannt werden. Der Vertikallobus ist mit seinen fünf Gyri charakteristisch geformt (Abb. 12F), im Gegensatz zu den kuppelförmigen Vertikalloben der untersuchten Arten der Decabrachia. Eingebettet zwischen die Kernschichten der oberen Frontalloben und der posterioren Buccalloben konnten die beim Schlüpfiling noch winzigen Neuropile der Subfrontalloben erkannt werden. Über den dorsalen Basalloben sind die subpedunkulaten Loben zu erkennen.

Die Statocysten des Schlüpfiling von *O. vulgaris* haben im Tangentialschnitt ein ringförmiges Profil (d.h. unbeeinträchtigt von Schrumpfung; maximaler Durchmesser 280  $\mu\text{m}$ ) und sind in Seitenansicht oval geformt, wobei sie sich an beiden Enden verjüngen (Abb. 11F+G). Die Geruchsorgane ( $115 \times 100 \times 35 \mu\text{m}^3$ ) liegen direkt hinter den optischen Loben genau unter deren Äquator (Abb. 11F, 12F).

### 3.1.8 Morphometrie

Die durch die Segmentierung gewonnenen Volumina der einzelnen Loben wurden als absolute und relative Volumenwerte in Tabellen dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden einige Loben der supraoesophagealen Masse zu funktionellen Einheiten zusammengefasst (siehe Tabelle 10).

**Absolute Volumenwerte:** Die Größe der rekonstruierten Kopfregionen der untersuchten Schlüpflinge nimmt in der folgenden Reihenfolge ab: *Sepia officinalis*, *Rossia macrosoma*, *Idiosepius notoides*, *Sepietta obscura*, *Loligo vulgaris* und *Octopus vulgaris*.

Die Volumina der einzelnen untersuchten Strukturen (Taabelle 11) halten sich größtenteils an diese Reihenfolge, jedoch mit einigen Ausnahmen: *I. notoides* besitzt die größten Augen, Linsen, Retinae und äußere plexiforme Schichten, wohingegen die optischen Loben als Gesamtheit bei *S. officinalis* am größten sind. Die brachialen und pedalen Neuropile sind bei *I. notoides* größer als bei *R. macrosoma* (die anderen suboesophagealen Neuropile wurden bei letzterer nur teilweise rekonstruiert). Das gleiche gilt auch für alle supraoesophagealen Neuropile, aber nicht für die sub- und supraoesophagealen Loben als Ganzes. Dies kann dem hohen Neuropilanteil des ZNS bei *I. notoides* zugeschrieben werden. *R. macrosoma* besitzt die größten olfaktorischen Neuropile und auch bei *L. vulgaris* sind diese ziemlich groß. Die Werte für die hinteren Basallobenneuropile sind bei *S. officinalis* und *I. notoides* bemerkenswert hoch und bei letzterem auch die Werte für den Vertikallobus.

**Tabelle 11: Volumetrische Daten der Augen und des ZNS (absolute Werte).**

Volumen [ $10^{-3}\text{mm}^3$ ]	<i>Sepia officinalis</i>	<i>Rossia macrosoma</i>	<i>Sepietta obscura</i>	<i>Idiosepius notoides</i>	<i>Loligo vulgaris</i>	<i>Octopus vulgaris</i>
<b>Sehsystem</b>						
beide Augen	956,7	791,6	659,1	983,5	124,0	38,1
beide Linsen	105,8	64,3	66,2	113,9	6,2	1,6
beide Retinae	382,4	218,7	254,2	548,0	85,9	17,8
beide optische Loben	1963,7	1140,9	1260,8	1671,5	297,4	56,1
Neuropil der Medulla	626,3	231,4	217,0	-	63,7	6,6
äußere plexiforme Schicht	207,8	129,5	179,0	242,4	34,9	7,4
<b>suboesophageales System (inkl. der Magnocellularloben)</b>						
brachiales Neuropil	18,2	12,4	11,1	14,4	2,0	1,1
pedales Neuropil	81,8	35,7	48,0	56,0	10,8	2,3
pallioviscerales Neuropil	66,3	12,6*[30,0]	35,6	40,7	8,2	3,3
magnocelluläres Neuropil	57,1	12,7*[32,2]	24,7	18,7	7,2	0,7
Σ der suboesophagealen Neuropile	223,4	73,4*[110,3]	119,4	129,8	28,2	7,4
suboesophageale Loben (inkl. Perikarya)	485,3	234,9*[355,7]	304,3	204,6	81,3	24,9
<b>supraoesophageales System</b>						
inferiores Frontalsystem	15,3	6,8	7,6	8,3	1,3	1,0
Vertikalissystem	73,6	33,5	43,2	70,2	9,1	1,5
anteriores basales Neuropil	38,0	17,3	19,5	24,6	5,4	1,0
posteriorer basales Neuropil	95,8	25,7	45,1	51,7	14,1	2,5
Pedunkelneuropil	16,7	11,0	10,0	12,6	4,5	1,0
olfaktorisches Neuropil	1,8	2,3	0,8	1,2	1,7	0,3
Σ der supraoesophagealen Neuropile	241,3	96,7	126,2	168,5	36,1	7,3
supraoesophageale Loben (inkl. Perikarya)	489,0	374,4	347,3	289,9	107,6	28,4

- nicht bestimmt (schlechte Strukturhaltung).

\* nicht komplett rekonstruiert (unvollständige Serie), Werte in Klammern sind Näherungen unter der Annahme, dass das Volumenverhältnis von sub- zu supraoesophagealen Loben dem der beiden anderen untersuchten Sepioiden von 0,95/1 entspricht und dass das suboesophageale Neuropil einen Anteil von 31% ausmacht. Die inferioren Buccalloben und die Subradularganglien sind nicht mit eingeschlossen (siehe Frösch 1971).

**Relative Volumenwerte:** Die relativen Neuropilvolumina, d.h. der Prozentsatz, den ein ausgewähltes Neuropil vom Neuropil des gesamten ZNS einnimmt, sind unabhängig von der Körpergröße und deshalb für direkte interspezifische Vergleiche besonders geeignet. Einen Überblick gibt Abbildung 30 auf der Basis der Werte aus Tabelle 12 (für *R. macrosoma* wurden aufgrund unvollständiger Rekonstruktion der Palliovisceralloben Schätzwerte angegeben). Vergleichsweise auffallend groß dimensionierte Neuropile wurden in den Palliovisceral-, Brachial- und unteren Frontalloben, wie auch im gesamten suboesophagealen Neuropil von *O. vulgaris*, in den hinteren Basalloben und olfaktorischen Loben bei *L. vulgaris*

und im Vertikalissystem bei *I. notoides* gefunden. Bei den beiden letzteren Arten liegen die Volumina der supraoesophagealen Loben 10% über dem Durchschnitt. Die Neuropile der Pedunkel- und olfaktorischen Loben sind bei *L. vulgaris* und *O. vulgaris* vergleichsweise groß, die Magnocellularneuropile sind bei Letzterem und *I. notoides* nur schwach entwickelt.

**Tabelle 12: Volumetrische Daten des ZNS (relative Werte).**

<b>Volumina % der sub- + supraoesophagealen Neuropile</b>	<i>Sepia officinalis</i>	<i>Rossia macrosoma</i>	<i>Sepietta obscura</i>	<i>Idiosepius notoides</i>	<i>Loligo vulgaris</i>	<i>Octopus vulgaris</i>
<b>suboesophageale Loben</b>	48,1	43,1 [53,2]	48,9	43,5	43,9	50,3
Brachialloben	3,9	7,3 [6,0]	4,6	4,8	3,1	7,5
Pedalloben	17,6	21,0 [17,2]	19,7	18,8	16,8	15,6
Palliovisceralloben	14,3	7,4 [14,5]	14,6	13,6	12,8	22,4
Magnocellularloben	12,3	7,4 [15,5]	10,0	6,3	11,2	4,8
<b>supraoesophageale Loben</b>	51,9	56,9 [46,8]	51,1	56,5	56,1	49,7
Inferiore Frontalloben	3,3	4,0 [3,3]	3,1	2,8	2,0	6,8
Vertikalissystem	15,8	19,7 [16,2]	18,7	23,5	14,2	10,2
anteriore Basalloben	8,2	10,2 [8,4]	8,0	8,2	8,4	6,8
posteriore Basalloben	20,6	15,1 [12,4]	16,9	17,3	21,9	17,0
Pedunkelloben	3,6	6,5 [5,3]	4,1	4,2	7,0	6,8
olfaktorische Loben	0,4	1,4 [1,1]	0,3	0,4	2,6	2,0
<b>Ratios</b>						
optische Loben : Retinae	5,1	5,2	5,0	3,0	3,5	3,2
Medulla Neuropil : optische Loben	0,32	0,20	0,17	-	0,21	0,12
optische Loben : (sub- + supraoesophageale Loben)	2,0	1,87 [1,56]	1,93	3,38	1,57	1,05
Medulla Neuropil : (sub- + supraoesophageale Neuropile)	1,35	1,36 [1,56]	0,89	-	0,99	0,45
suboesophageale Neuropile : suboesophageale Loben	0,46	0,31*	0,39	0,63	0,35	0,30
supraoesophageale Neuropile : supraoesophageale Loben	0,49	0,26	0,36	0,58	0,34	0,26

\* Unsicherer Wert aufgrund von unvollständiger Erfassung der posterioren palliovisceralen und magnocellularen Regionen.

Die Werte in Klammern sind Näherungen, denen ein angenommenes Verhältnis der sub-/supraoesophagealen Loben von 0,95/1 wie bei den beiden anderen untersuchten Sepioidea und ein Neuropilanteil von 31% zugrunde liegt.

Andere signifikante Verhältniswerte können zwischen verschiedenen Kompartimenten innerhalb des ZNS berechnet werden. So machen bei allen Arten die Pedalloben den größten Anteil am Neuropil der suboesophagealen Masse aus, an zweiter Stelle folgen die Palliovisceralloben mit Ausnahme von *Loligo vulgaris*. Die Neuropile der hinteren Basal- und der Vertikalloben sind die größten supraoesophagealen Anteile, wobei das Übergewicht interspezifisch variiert. Die supraoesophagealen Loben machen einen Anteil zwischen 50%

(*O. vulgaris*) und 56% (*L. vulgaris*, *I. notoides*) des Volumens des gesamten Gehirns (sub- und supraoesophageale Loben) aus. Vergleicht man nur die Neuropilvolumina, erreicht der supraoesophageale Anteil bei *I. notoides* und *L. vulgaris* sogar 65%. Der Neuropilanteil der Hirnloben macht zwischen 26% und 63% aus (Tabelle 12). Im Allgemeinen machen die Neuropilvolumina bei den suboesophagealen Loben einen größeren Prozentsatz aus, als bei den supraoesophagealen Loben (außer bei *S. officinalis*). Die beiden optischen Loben sind gemessen am Gesamtgehirn immer geringfügig größer (*O. vulgaris*: 105%) oder sogar wesentlich größer (*I. notoides*: 338 %). Bezüglich der Neuropilvolumina sind die optischen Loben (von 45% bei *O. vulgaris* bis 135% bei *S. officinalis*) aufgrund des geringen Neuropilanteils zwischen 12% und 32% nicht besonders auffällig. Das Verhältnis des Volumens der optischen Loben zum Retinavolumen beträgt bei den drei sepioiden Arten 5 und bei den anderen Arten ungefähr 3.

## 3.2 Retinotopie / Chiasma opticum

Um die Verschaltung der Photorezeptoren in der plexiformen Schicht zu verstehen (Retinotopie, Konnektivität), wurden zwei Ansätze erprobt, um die Axone der Photorezeptoren zu ihrem Terminationsort zu verfolgen. Zum einen wurden zwei Semidünnschnittserien angefertigt, auf deren Schnitten jeweils die Region abgebildet war, in der das Auge auf den optischen Lobus trifft, und diese in Amira® partiell rekonstruiert (Kap. 3.2.1). Zum anderen wurden Neurotracing-Versuche durchgeführt, um die Photorezeptoraxone fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen und so verfolgen zu können (Kap. 3.2.2). Ziel war es mit diesen Versuchen die Stelle zu finden, an der die Axone der Photorezeptoren auf kürzestem und direktem Weg zum optischen Lobus ziehen (d.h. möglichst ohne Chiasma), um das Projektionsgebiet dann wiederum elektronenmikroskopisch genauer untersuchen zu können (Kap. 3.3).

### 3.2.1 Semidünnschnittserien

Für die **erste Semidünnschnittserie** wurde der Kopf des Schlüpfings so ausgerichtet, dass von schräg vorne auf das Auge zu geschnitten wurde (siehe Abb. 21A) und auf fast jedem Schnitt Auge **und** optischer Lobus gleichzeitig getroffen wurden (Abb. 21B+C). Dabei wurden die Schnitte erst proximal der Linse aufgefangen und solange geschnitten bis der immer kleiner werdende Anteil des Auges schließlich ganz verschwand. In Amira® wurde versucht den Verlauf der optischen Nerven vom Auge zum optischen Lobus darzustellen (Abb. 21E). Bei der manuellen Segmentierung konnten Nervenbündel (aus jeweils einigen Axonen) auf einzelnen Schnitten gut erkannt werden, es erwies sich jedoch oft als schwierig, diese auf benachbarten Schnitten wiederzufinden. Zudem war die Identifizierung der einzelnen Nervenbündel erst nach ihrem Austritt aus dem Auge möglich, da die Fasern im retinalen Plexus zu sehr miteinander verflochten sind. Dies ermöglicht auf lichtmikroskopischem Auflösungs-niveau zwar eine relativ genaue Eingrenzung der Retinaregion aus der die Axone kommen, aber keine präzise Identifikation der zugehörigen Sehzellen (Abb. 21C). Proximal konnten diese Bündel auch nur bis zur äußeren Körnerschicht des optischen Lobus verfolgt werden. Hier spalten sich die Bündel auf und konnten deshalb nicht bis in die äußere

plexiforme Schicht hinein erkannt werden. Insgesamt gelang es so nur bei einigen Nervenbündeln, sie über wenige Schnitte hinweg zu verfolgen und zu rekonstruieren. Diese befanden sich vor allem in einer ventralen Region, in der sehr viele Bündel nebeneinander auftraten.

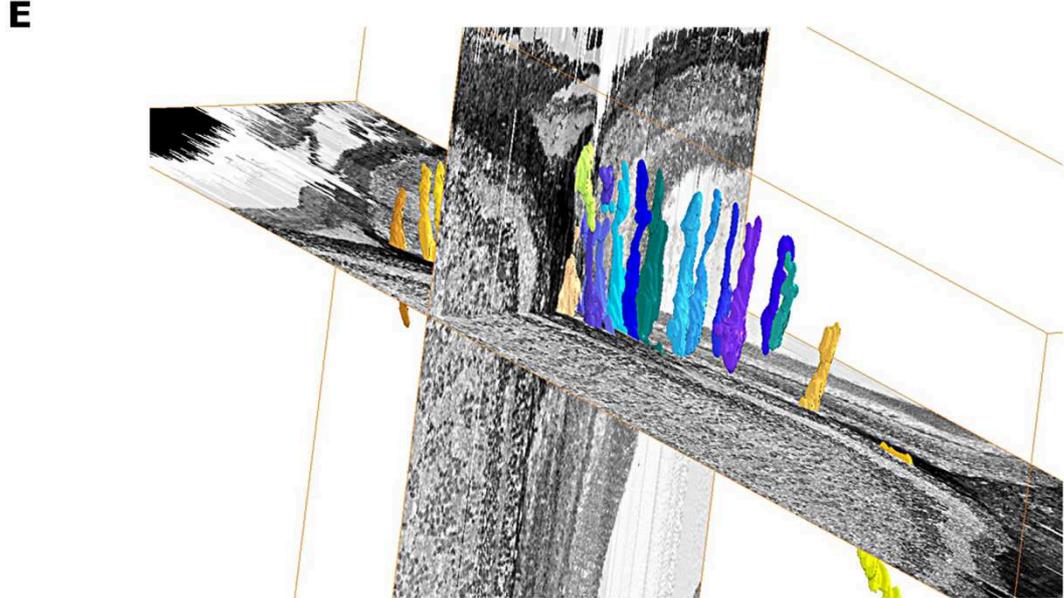
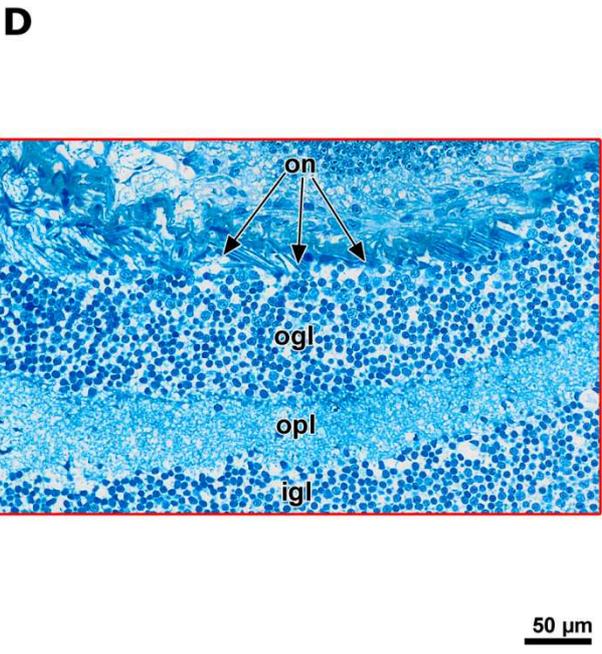
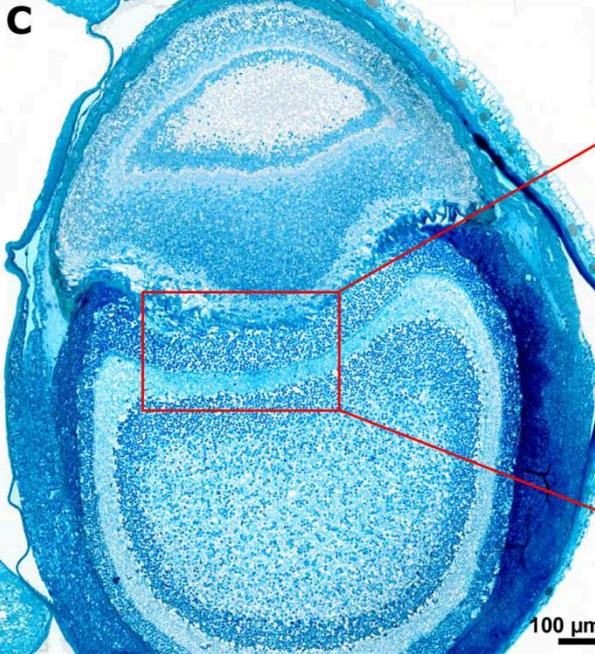
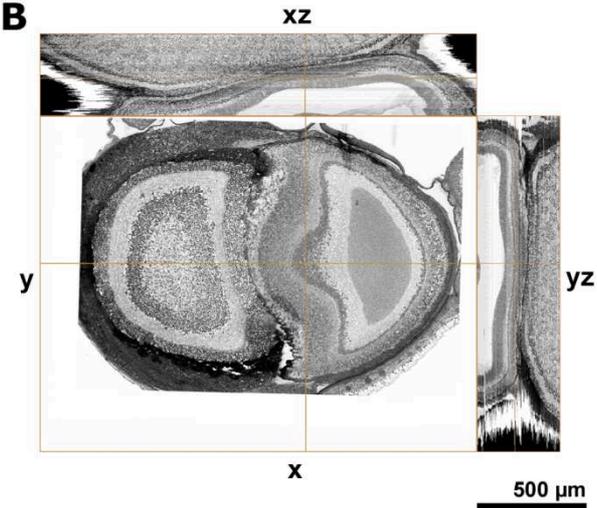
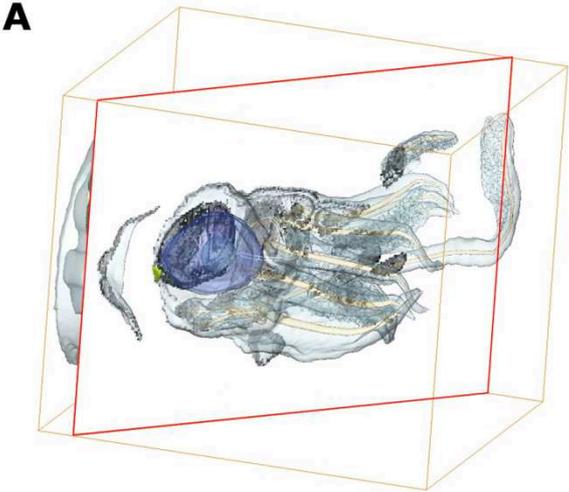
Um die einzelnen Bündel besser erkennen zu können, wurden von der interessanten Region zwischen Auge und optischem Lobus Detailbilder mit höherer Auflösung erstellt (Tabelle 6, Abb. 21D). Aber auch hier konnten die Bündel nicht besser verfolgt werden, weswegen auf eine weitere zeitaufwändige Oberflächenrekonstruktion dieser Schnittserie verzichtet wurde.

---

**Abbildung 21: Semidünnschnittserie 1 durch das Auge und die Retina profunda eines Schlüpfings von *Sepia officinalis* sowie 3D-Rekonstruktion der optischen Nerven.** ▶

- A:** 3D-Modell der Kopfregion eines Schlüpfings mit eingezeichneter Schnittebene (rot).  
**B:** Ausgewählte xy-, yz- und xz-Ebenen des gesamten Bilderstapels.  
**C:** Richardson-gefärbtes Übersichtsbild des Auges und des optischen Lobus. Der rote Rahmen markiert den in D dargestellten Bereich.  
**D:** Richardson-gefärbtes Detailbild der Retina profunda und der optischen Nerven.  
**E:** 3D-Rekonstruktion der optischen Nerven mit ausgewählter xz- und yz-Ebene.

**igl:** innere Körnerschicht, **ogl:** äußere Körnerschicht, **on:** optische Nerven, **opl:** äußere plexiforme Schicht.



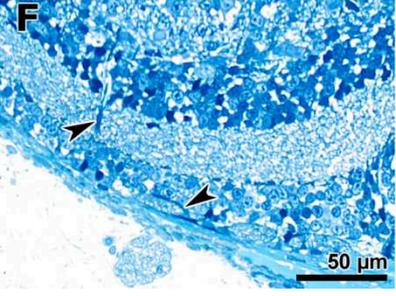
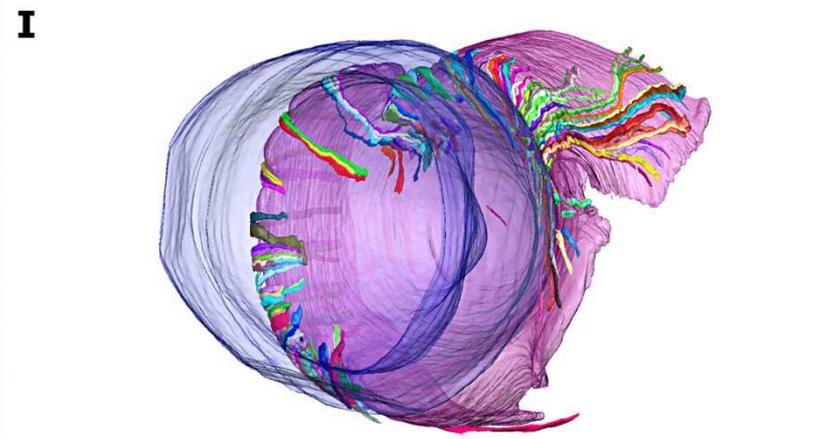
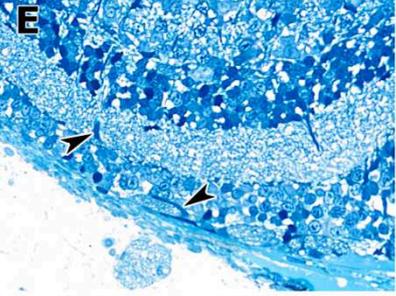
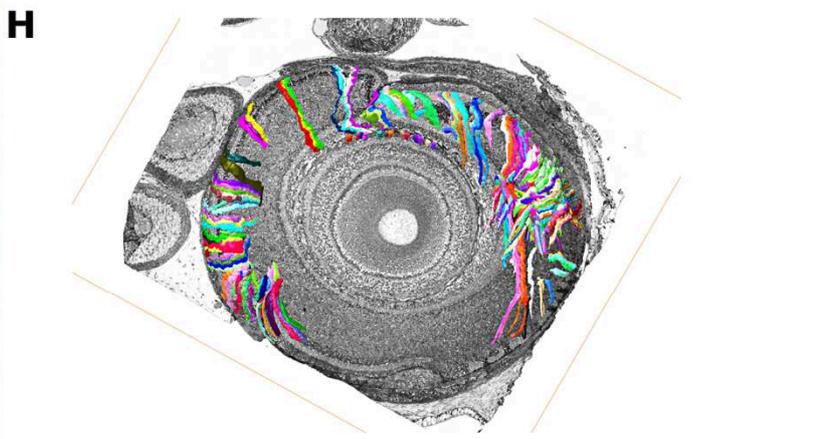
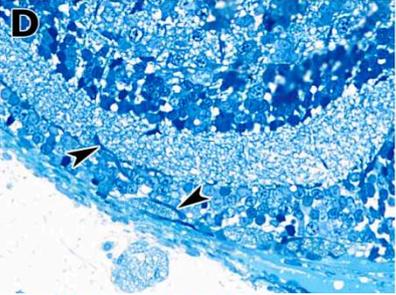
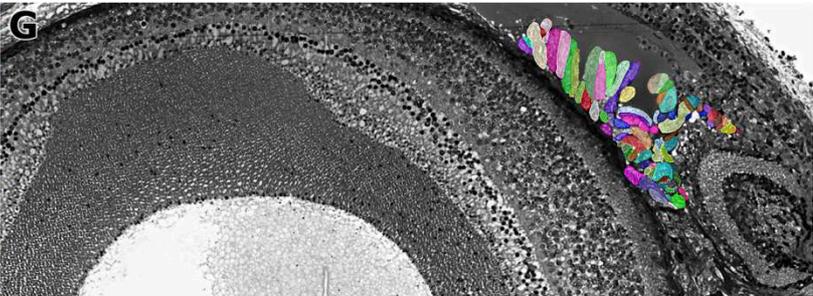
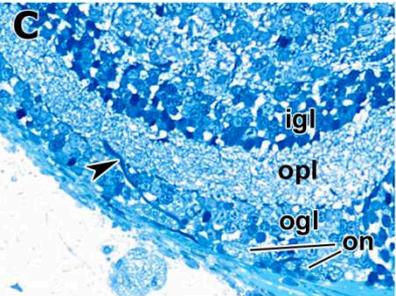
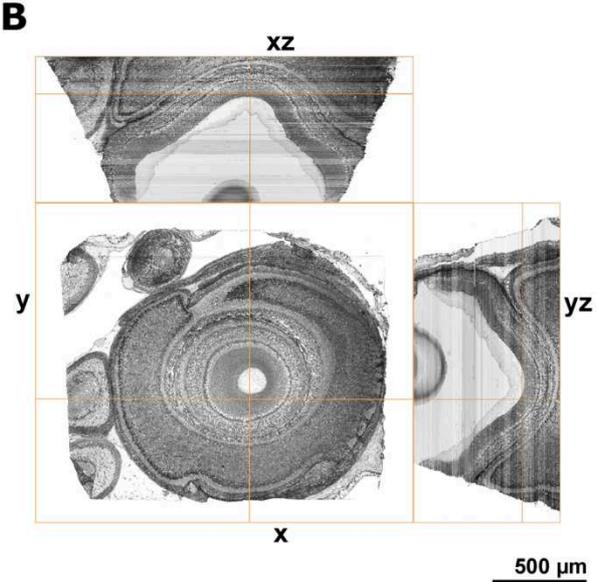
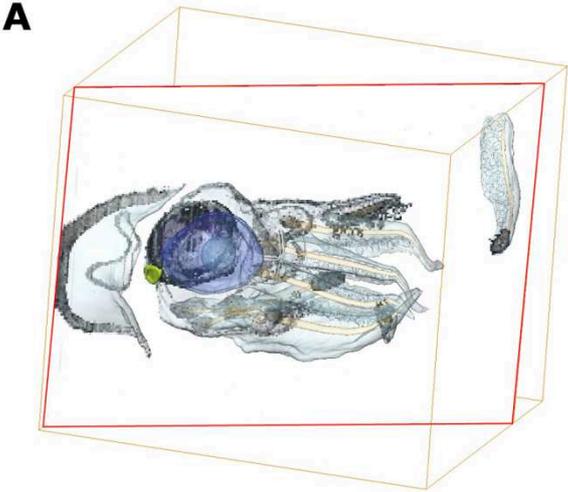
Die **zweite Semidünnschnittserie** wurde von der Seite so auf das Auge zu geschnitten, dass der Retinafundus horizontal getroffen wurde und die Retinaschichten in fast gleichmäßigen konzentrischen Kreisen auf den Schnitten zu sehen waren ( $\pm$  senkrecht zur optischen Achse; Abb. 22A+B). Hier konnten viele Nervenbündel auf ihrem Weg aus dem Auge um den optischen Lobus verfolgt und rekonstruiert werden. Jedoch wurden sie dabei immer dünner und schlechter zu erkennen, da immer wieder einzelne Nervenfasern aus den Bündeln durch die äußere Körnerschicht zur äußeren plexiformen Schicht zogen. Vereinzelt konnten dunkler gefärbte Nervenfasern, die in die Medulla des optischen Lobus ziehen oder von ihr kommen, relativ gut direkt gesehen werden (Abb. 22C-F: ►), die lichtmikroskopische Auflösung reichte aber nicht aus, sie weiter zu verfolgen. Bei der Rückverfolgung der optischen Fasern zur Retina wurde es zunehmend schwieriger die einzelnen Bündel zu differenzieren, da die Nervenfasern hier immer enger aneinanderrückten und auch stärker angefärbt waren. Für die 3D-Darstellung wurden auch die Oberflächen der Retina und der äußeren plexiformen Schicht rekonstruiert, um den Verlauf der Nervenbündel besser verstehen zu können. Die äußere plexiforme Schicht folgt im distalen, konkaven Teil der Krümmung der Retina, bis sie dann nach proximal konvex abbiegt. Die Nervenfasern verlaufen nach ihrem Austritt aus der Retina entlang dieser Krümmung und ziehen dann ebenfalls nach proximal entlang der äußeren plexiformen Schicht (Abb. 22H+I).

---

**Abbildung 22: Semidünnschnittserie 2 durch das Auge und die Retina profunda eines Schlüpfings von *Sepia officinalis* sowie 3D-Rekonstruktion der optischen Nerven.** ►

- A:** 3D-Modell der Kopfregion eines Schlüpfings mit eingezeichneter Schnittebene (rot).  
**B:** Ausgewählte xy-, yz- und xz-Ebenen des gesamten Bilderstapels.  
**C-F:** Ausgewählte aufeinanderfolgende Detailbilder des Cortex des optischen Lobus mit optischen Nerven und einer in den optischen Lobus ziehenden Nervenfaser (Pfeilspitze).  
**G:** Histologisches Detailbild der Retina und der austretenden optischen Nerven (farbig, schraffiert dargestellt).  
**H:** 3D-Rekonstruktion der optischen Nerven mit einer eingeblendeten Schnittebene.  
**I:** 3D-Rekonstruktion der Retina (dunkelblau transparent) und der plexiformen Schicht (magenta transparent) sowie der optischen Nerven.

**lgl:** innere Körnerschicht, **ogl:** äußere Körnerschicht, **on:** optische Nerven **opl:** äußere plexiforme Schicht.



### 3.2.2 Fluoreszenzversuche

Die Laufversuche mit den lipophilen Neurotracing-Farbstoffen haben zu unterschiedlich guten Ergebnissen geführt. Teilweise waren die Farbstoffe nicht gewandert oder das Gewebe zerfiel beim Schneiden am Vibratom. Dargestellt werden hier nur ausgewählte Bilder der erfolgreichen Versuche (5 von 21, Abb. 23-25, siehe auch Tabelle 4).

Sowohl bei den Versuchen mit nur einem Farbstoff (Dil; Abb. 23, 25) als auch bei den Versuchen mit Mehrfachfärbungen (Dil, DiO, DiA; Abb. 24) kann anhand der am **Fluoreszenz-Stereomikroskop** erstellten Übersichtsbilder des formaldehydfixierten Materials zunächst eine radiale Ausbreitung des fluoreszierenden Farbstoffs entlang der Photorezeptoren in den äußeren Bereich der optischen Loben beobachtet werden. Besonders stark leuchten dabei die distalen Segmente der Photorezeptoren, auf deren Spitzen die Kristalle aufgelegt wurden. Hier kommt es jedoch oft zu einer starken Überstrahlung der Präparate, so dass feine Fasern nicht zu erkennen sind. Der fluoreszierende Farbstoff hat sich im Anschluss an die Retina entlang der optischen Fasern gut ausgebreitet, was auf den Übersichtsbildern jedoch nur schwach zu erkennen ist (Abb. 23A-D, 24A+B). Bei stärkerer Vergrößerung können aber bereits auf den stereomikroskopischen Detailbildern die optischen Nerven gesehen werden, die um den optischen Lobus zu ihrem Terminationsort laufen (Abb. 23E+F, 24C-F).

---

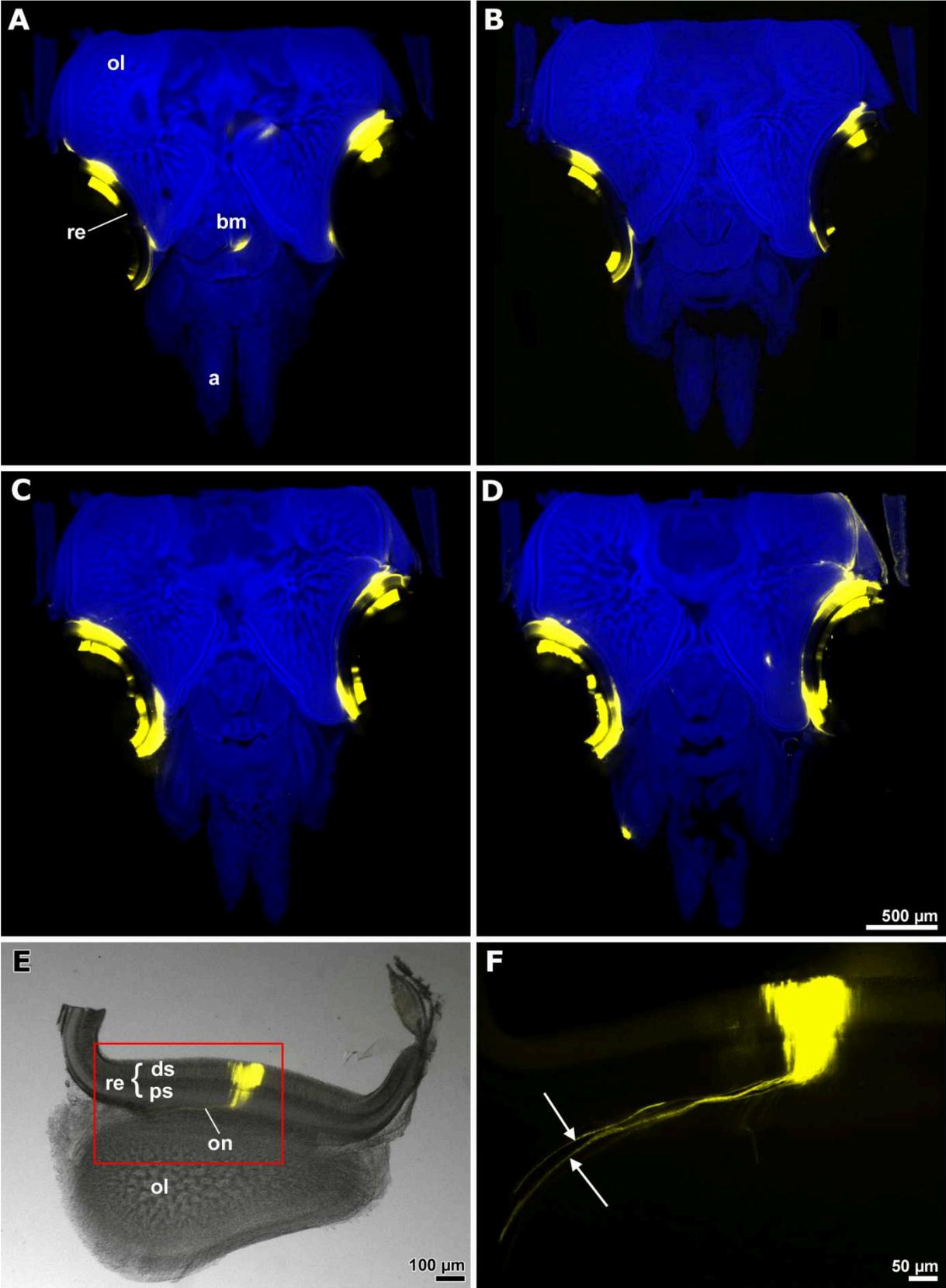
#### Abbildung 23: Fluoreszenzstereomikroskopie mit einem Neurotracingfarbstoff (Dil). ▶

**A-D:** Stereomikroskopische Übersichtsbilder der mit **DAPI** (blau) und dem lipophilen Tracingfarbstoff **Dil** (gelb) gefärbten Horizontalschnitte durch den Kopf eines Schlüpfings von *Sepia officinalis* (siehe Tabelle 4, Nr. 10).

**E:** Stereomikroskopisches Übersichtsbild eines mit Dil (gelb) gefärbten Schnittes (siehe Tabelle 4, Nr. 20, linkes Auge).

**F:** Stereomikroskopische Detailaufnahme eines Ausschnitts aus E (roter Rahmen), wobei nur der Dil-Kanal abgebildet ist. Die Pfeile zeigen auf die Photorezeptoraxone (siehe Tabelle 4, Nr. 20, linkes Auge).

**bm:** Buccalmasse, **ds:** distale Segmente der Photorezeptoren, **ol:** optische Loben, **on:** optische Nerven, **ps:** proximale Segmente der Photorezeptoren, **re:** Retina.



Bei **Einzelfärbung** mit Dil und Kernfärbung mit DAPI ist der Tracingfarbstoff auf Schnitten nahe dem Auflegeort des Kristalls bis zu den proximalen Segmenten sehr gut gelaufen und leuchtet hier auch noch stark. Die einzelnen optischen Fasern sind hier jedoch nicht zu identifizieren. Auf den angrenzenden Schnitten, die weiter vom Auflegeort entfernt liegen, leuchten die distalen und proximalen Segmente nur noch schwach, dafür kann man die Sehnerven besser erkennen. Wurde während der Präparation mit Dil das Gewebe verletzt, ist der Farbstoff tiefer in den optischen Lobus eingedrungen und konnte sich weiter verbreiten (Abb. 23C+D). Teilweise sind beim Schneiden Verunreinigungen mit Dil entstanden, die im Bereich des Schnabels (Abb. 23A) und der Arme (Abb. 23D) zu sehen sind. Die optischen Fasern knicken nach den proximalen Segmenten zur Seite hin weg und verlaufen dann um den optischen Lobus und folgen diesem dabei in seiner Krümmung (Abb. 23E+F). Außerdem können hier ganz schwach auch Axonbündel gesehen werden, die durch die äußere Körnerschicht zur äußeren plexiformen Schicht ziehen.

---

**Abbildung 24: Fluoreszenzstereomikroskopie mit mehreren Neurotracingfarbstoffen.** ►

**A+B:** stereomikroskopische Übersichtsbilder der mit **DAPI** (blau) und den lipophilen Tracingfarbstoffen **DiO** (grün), **Dil** (gelb), **DiA** (rot) gefärbten Horizontalschnitte durch den Kopf eines Schlüpfings von *Sepia officinalis*. Im rechten Auge wurden die Kristalle horizontal und im linken Augen vertikal aufgetragen (siehe Tabelle 4, Nr. 6).

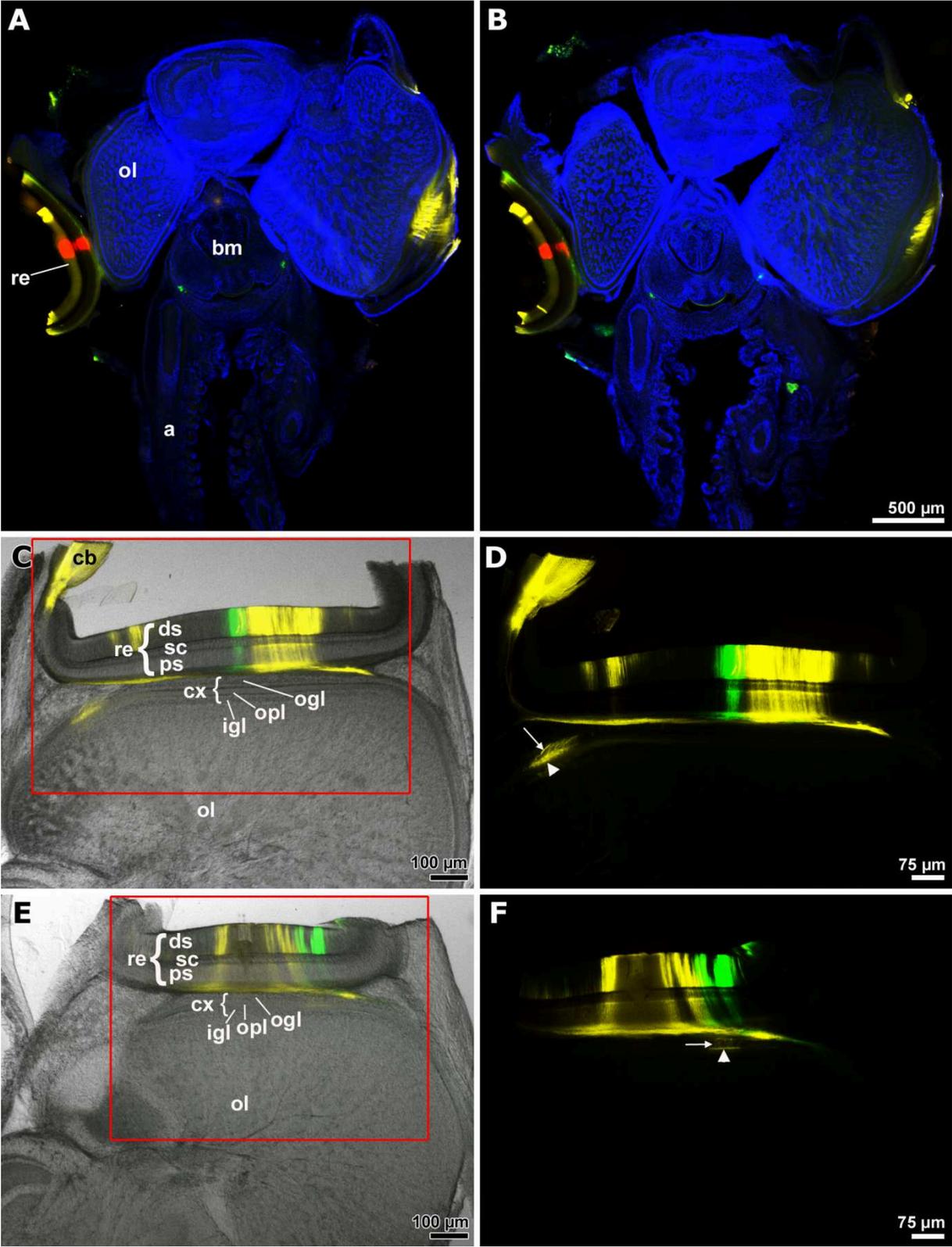
**C:** stereomikroskopisches Übersichtsbild eines mit **Dil** (gelb) und **DiO** (grün) gefärbten Horizontalschnitts (siehe Tabelle 4, Nr. 20, rechtes Auge).

**D:** stereomikroskopische Detailaufnahme eines Ausschnitts aus C (roter Rahmen). Der Pfeil zeigt auf die Photorezeptoraxone, die Pfeilspitze auf die Photorezeptorterminals (siehe Tabelle 4, Nr. 20, rechtes Auge).

**E:** stereomikroskopisches Übersichtsbild eines mit **Dil** (gelb) und **DiO** (grün) gefärbten Horizontalschnitts (siehe Tabelle 4, Nr. 21, rechtes Auge).

**F:** stereomikroskopische Detailaufnahme eines Ausschnitts aus E (roter Rahmen). Der Pfeil zeigt auf die Photorezeptoraxone, die Pfeilspitze auf die Photorezeptorterminals (siehe Tabelle 4, Nr. 21, rechtes Auge).

**bm:** Buccalmasse, **cb:** Ziliarkörper, **cx:** Cortex, **ds:** distale Segmente der Photorezeptoren, **igl:** innere Körnerschicht, **ogl:** äußere Körnerschicht, **ol:** optische Loben, **on:** optische Nerven, **opl:** äußere plexiforme Schicht, **ps:** proximale Segmente der Photorezeptoren, **re:** Retina, **sc:** Stützzellen.



Bei den **Mehrfachfärbungen** mit drei Tracingfarbstoffen (DiI, DiO und DiA) sind alle drei Farbstoffe gelaufen und können voneinander separiert gezeigt werden (Abb. 24). Es ist jedoch schwierig, DiI und DiA am Stereomikroskop getrennt zu detektieren, da beide Farbstoffe in der vorgegebenen Hardware-Konfiguration mit dem mCherry-Filter ( $\lambda_{\text{ex}} = 540 - 580 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 600 - 610 \text{ nm}$ ) aufgenommen werden müssen. So konnten diese beiden Farbstoffe lediglich durch ihre Positionierung auf der Retina voneinander unterschieden werden. DiA (orange) ist nur bis zum retinalen Plexus zu sehen, wo auch einige Axone gefärbt sind, aber der Farbstoff ist nicht weiter gelaufen. DiO ist auf den Übersichtsbildern nur schwach erkennbar, nämlich erst im Bereich der proximalen Segmente (Abb. 24A+B). Die dazugehörigen distalen Segmente liegen dabei aufgrund der schiefen Schnittrichtung auf den nachfolgenden Schnitten, die nicht abgebildet sind. Der retinale Plexus wurde jedoch gut angefärbt und die abgehenden optischen Fasern kann man deutlich erkennen. Diese verlaufen vom Retinarand sogar bis zur Mitte der Retina, von wo sie dann weiter zum optischen Lobus ziehen.

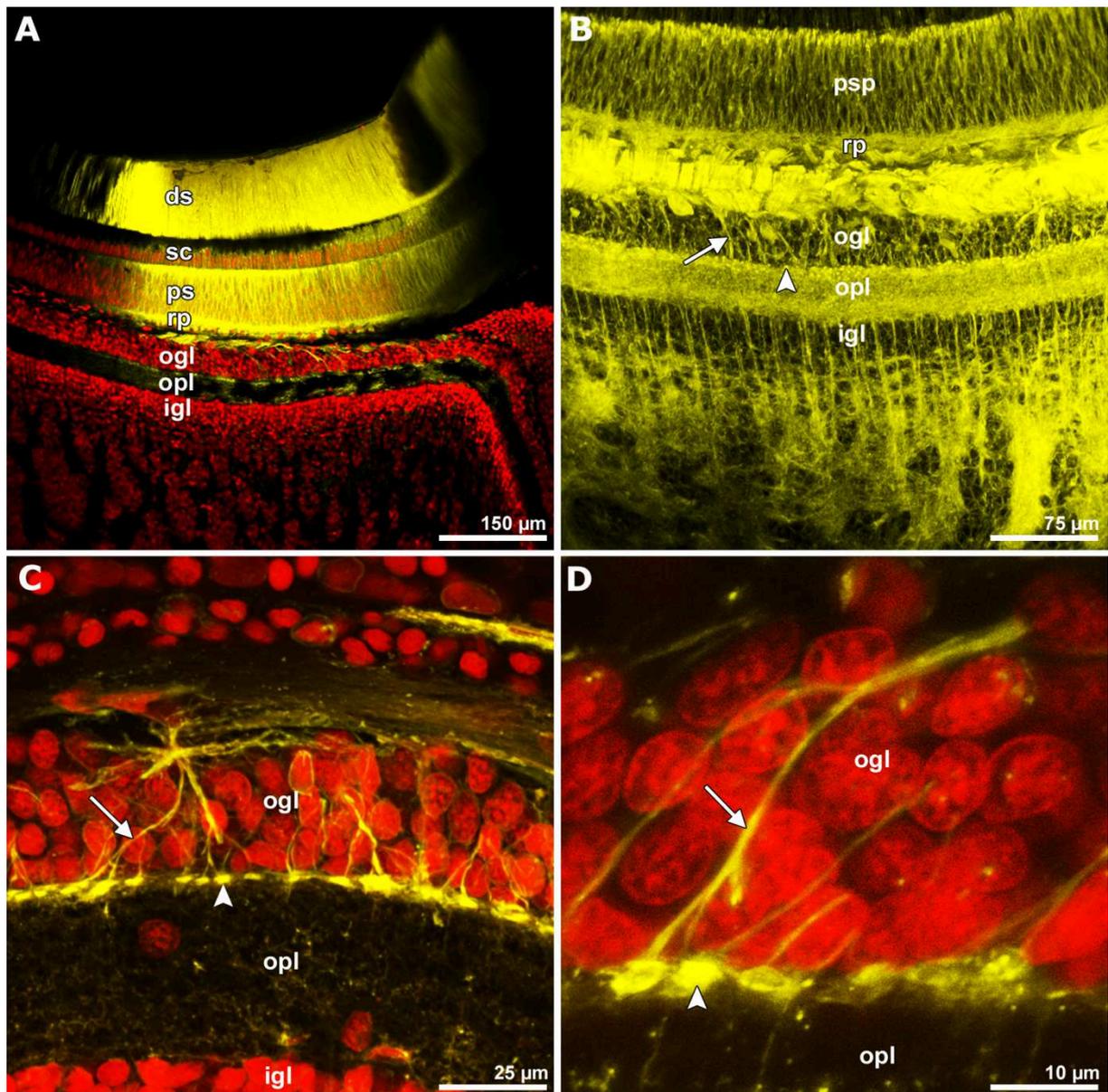
Für die weiteren Versuche wurden nur noch **Doppelfärbungen** mit DiI und DiO durchgeführt, da diese am Fluoreszenz-Stereomikroskop mit unterschiedlichen Filtern (DiI: m-Cherry, DiO: GFP Plants) detektiert werden und somit eindeutig unterscheidbar sind. Dadurch war es auch möglich, bei der Präparation die Kristalle direkt nebeneinander auf die Retina zu legen. Somit können hier die Axone benachbarter Photorezeptorzellgruppen dargestellt und verfolgt werden. Die Färbung mit DiI fällt stärker aus und es ist auch weiter gelaufen als DiO (Abb. 24C-F). Die von DiO angefärbten optischen Fasern werden teilweise von den mit DiI angefärbten überstrahlt (Abb. 24C+D), so dass sie nur schwer zu identifizieren sind. Es sind einige Photorezeptoraxone (Abb. 24D: →) zu sehen, die durch die äußere Körnerschicht zur äußeren plexiformen Schicht ziehen und hier die Terminalen ausbilden, die als kleine hell leuchtende Pünktchen dargestellt werden (Abb. 24D: ►). Jedoch ist der gesamte Verlauf dieser Axone vom retinalen Plexus bis zur äußeren plexiformen Schicht nicht nachvollziehbar, da die Axone nur im Bereich der äußeren Körnerschicht angefärbt bzw. auf dem besagten Schnitt nicht vollständig enthalten sind. Im Bereich der Zellkerne der Stützzellen ist die Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen nur sehr schwach (Abb. 24C-F). Die Photorezeptoren werden hier von den Stützzellen überlagert und in ihrem Querschnitt eingeschränkt. Die stark mit DiI angefärbten optischen Nerven verlaufen von den mittig gelegenen

Photorezeptoren nach rechts um den optischen Lobus und dabei spalten sich einige Axone (Abb. 24F: →) ab und ziehen durch die äußere Körnerschicht zur äußeren plexiformen Schicht, wo sie den Terminationshorizont ausbilden (Abb. 24F: ►). Die von den mit DiO angefärbten Photorezeptoren, die weiter rechts in Richtung Retinarand liegen, ausgehenden optischen Fasern verlaufen noch weiter nach rechts um den optischen Lobus, als die von Dil angefärbten, bis sie nicht mehr erkannt werden können.

Anhand der Fluoreszenzfärbungen konnten die Photorezeptoren und ihre Nervenfasern sichtbar gemacht werden. Am Fluoreszenz-Stereomikroskop konnten die Photorezeptoraxone und ihre Endigungen zwar dargestellt werden, aber nicht besonders hochauflösend. Deshalb erfolgte eine weitere Betrachtung am CLSM (confocal laser scanning microscope), v.a. um mehr über die Photorezeptorendigungen im optischen Lobus zu erfahren.

An den **konfokalmikroskopischen Bildern** kann man sehr gut die Schichten der Retina erkennen, und dass vor allem die distalen und proximalen Segmente der Photorezeptoren durch den lipophilen Tracingfarbstoff Dil intensiv angefärbt wurden (Abb. 25A). Auch der retinale Plexus leuchtet stark, da sich hier die Axone der Photorezeptoren ihren Anfang nehmen und dann gebündelt zum optischen Lobus ziehen. Je tiefer man jedoch in das Gewebe kommt, desto schwächer ist das Dil-Signal zu sehen (Abb. 25B). Anhand der Kernfärbung mit To-Pro-3 kann man gut erkennen, dass sich die Zellkerne der Photorezeptoren in den proximalen Segmenten befinden. Auch sieht man die Kerne der Stützzellen, die zwischen den distalen und proximalen Segmenten gelegen sind (Abb. 25A). Im optischen Lobus konzentrieren sich die Zellkerne in der äußeren und inneren Körnerschicht, in der äußeren plexiformen Schicht treten sie jedoch nur sehr vereinzelt auf. Am Übersichtsbild ohne Kernfärbung lässt sich der Verlauf der Axone der Photorezeptoren vom retinalen Plexus durch die äußere Körnerschicht (ogl) bis in die äußere plexiforme Schicht (opl) des optischen Lobus gut erkennen (Abb. 25B). Nach dem retinalen Plexus ziehen die Axone in sehr dichten und stark angefärbten Bündeln zum optischen Lobus. Hier lösen sich dann dünnere Stränge von den dickeren Bündeln ab und ziehen durch die äußere Körnerschicht zur äußeren plexiformen Schicht (Abb. 25B: →). Hier ist schließlich der synaptischen Horizont der Photorezeptorterminalen im distalen Bereich der plexiformen Schicht deutlich zu erkennen, da diese besonders gut durch die lipophilen Tracingfarbstoffe

angefärbt wurden (Abb. 25B: ►). Man sieht auch, dass der Farbstoff über die äußere plexiforme Schicht mit den Photorezeptorterminalen hinaus weiter gewandert ist. So kann man feine Fasern erkennen, die aus der äußeren plexiformen Schicht durch die innere Körnerschicht ziehen und sich dann im Neuropil der Medulla stark verzweigen (Abb. 25B). Die Detailbilder des Cortex mit äußerer Körnerschicht, äußerer plexiformer Schicht und innerer Körnerschicht zeigen sehr schön, wie die optischen Fasern (Abb. 25C+D: →) an den Zellen der äußeren Körnerschicht vorbei zur äußeren plexiformen Schicht ziehen und hier in die Photorezeptorterminalen übergehen (Abb. 25C+D: ►). Die Axone sind dabei zu Bündeln zusammengefasst und erst kurz vor der äußeren plexiformen Schicht spalten sich die einzelnen Axone ab. Dabei liegen die Terminalen, deren Axonen zu einem Faserbündel gehören, nebeneinander. Dies legt den Schluss nahe, dass sie auch zu nebeneinanderliegenden Photorezeptoren gehören. Die genaue Verschaltungslogik der Photorezeptoren mit ihren zugehörigen Endknöpfchen konnte aber anhand des kleinen Ausschnittes der hier untersuchten Struktur, leider nicht ermittelt werden.



**Abbildung 25: Konfokalmikroskopie der mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten Horizontalschnitte durch den Kopf eines Schlüpflings von *Sepia officinalis* (siehe Tabelle 4, Nr. 04).**

**A:** Übersichtsbild der Retina und des angrenzenden optischen Lobus gefärbt mit **Dil** (gelb) und **To-Pro-3** (rot).

**B:** Aufnahme der proximalen Retina und des optischen Lobus, gefärbt mit **Dil** (gelb). Der Pfeil zeigt auf ein Photorezeptoraxon und die Pfeilspitze auf eine Photorezeptorterminalscheibe.

**C:** Übersichtsbild des Cortex des optischen Lobus mit äußerer Körnerschicht (ogl), äußerer plexiformer Schicht (opl) und innerer Körnerschicht (igl), gefärbt mit **Dil** (gelb) und **To-Pro-3** (rot). Gut zu erkennen ist der Terminationshorizont der Photorezeptoraxone (Pfeil) mit den Photorezeptorterminalscheiben (Pfeilspitze).

**D:** Detailaufnahme der Grenzregion von äußerer Körnerschicht und plexiformer Schicht, in der sich die Terminalscheiben der Photorezeptoren (Pfeilspitze) befinden, gefärbt mit **Dil** (gelb) und **To-Pro-3** (rot).

**ds:** distale Segmente der Photorezeptoren, **igl:** innere Körnerschicht, **m:** Medulla, **ogl:** äußere Körnerschicht, **ol:** optischer Lobus, **opl:** äußere plexiforme Schicht, **ps:** proximale Segmente der Photorezeptoren, **re:** Retina, **rp:** retinaler Plexus, **sc:** Stützzellen.

### 3.3 Feinstruktur der plexiformen Schicht in 3D

Um ein dreidimensionales Bild der Feinstruktur der äußeren plexiformen Schicht zu erhalten und damit erste Hinweise auf die Verschaltung der Photorezeptorterminalen untereinander und mit Sekundärneuronen zu bekommen, wurden zwei elektronenmikroskopische Ansätze gewählt. Zuerst wurde eine Bilderserie von 137 Ultradünnschnitten (lückenlose Serie, s. Kap. 2.2.4) erstellt am Transmissionselektronenmikroskop fotografiert und mit Hilfe des Programms Amira® analysiert (Kap. 3.3.1). Beim zweiten Ansatz wurde ein FIB-FESEM-Gerät verwendet mit den zwei großen Vorteilen einer praktisch verzerrungsfreien Abbildung und einer unerreicht geringen Schnitttdicke (siehe Tabelle 6), bei gleichzeitig gegenüber dem TEM etwas schlechterem Kontrast und begrenztem Bildausschnitt (Kap. 3.3.2).

#### 3.3.1 serial sectioning TEM (ssTEM)

Auf den TEM-Übersichtsbildern sieht man bereits bei schwacher Vergrößerung gut die Struktur des Cortex im optischen Lobus (Abb. 26B): die äußere plexiforme Schicht erscheint als eine ca. 26 µm dicke Zone von miteinander verflochtenen Nervenfasern, darüber liegt die äußere Körnerschicht. Deutlich kann man die distal gelegene Zone der Photorezeptorterminalen erkennen, die als säckchenförmige Anschwellungen der Photorezeptoraxone zu sehen sind. Für die weitere Untersuchung und die anschließende 3D-Rekonstruktion wurde eben diese Region gewählt.

---

#### Abbildung 26: Histologie des Sehsystems und Feinstruktur der Retina profunda des optischen Lobus (TEM) von *Sepia officinalis*. ▶

**A:** Lichtmikroskopisches Übersichtsbild des Bereichs, wo Auge und optischer Lobus aneinander grenzen.

**B:** Transmissionselektronenmikroskopisches Übersichtsbild des Cortex mit äußerer Körnerschicht (ogl), äußerer plexiformer Schicht (opl) und innerer Körnerschicht (igl).

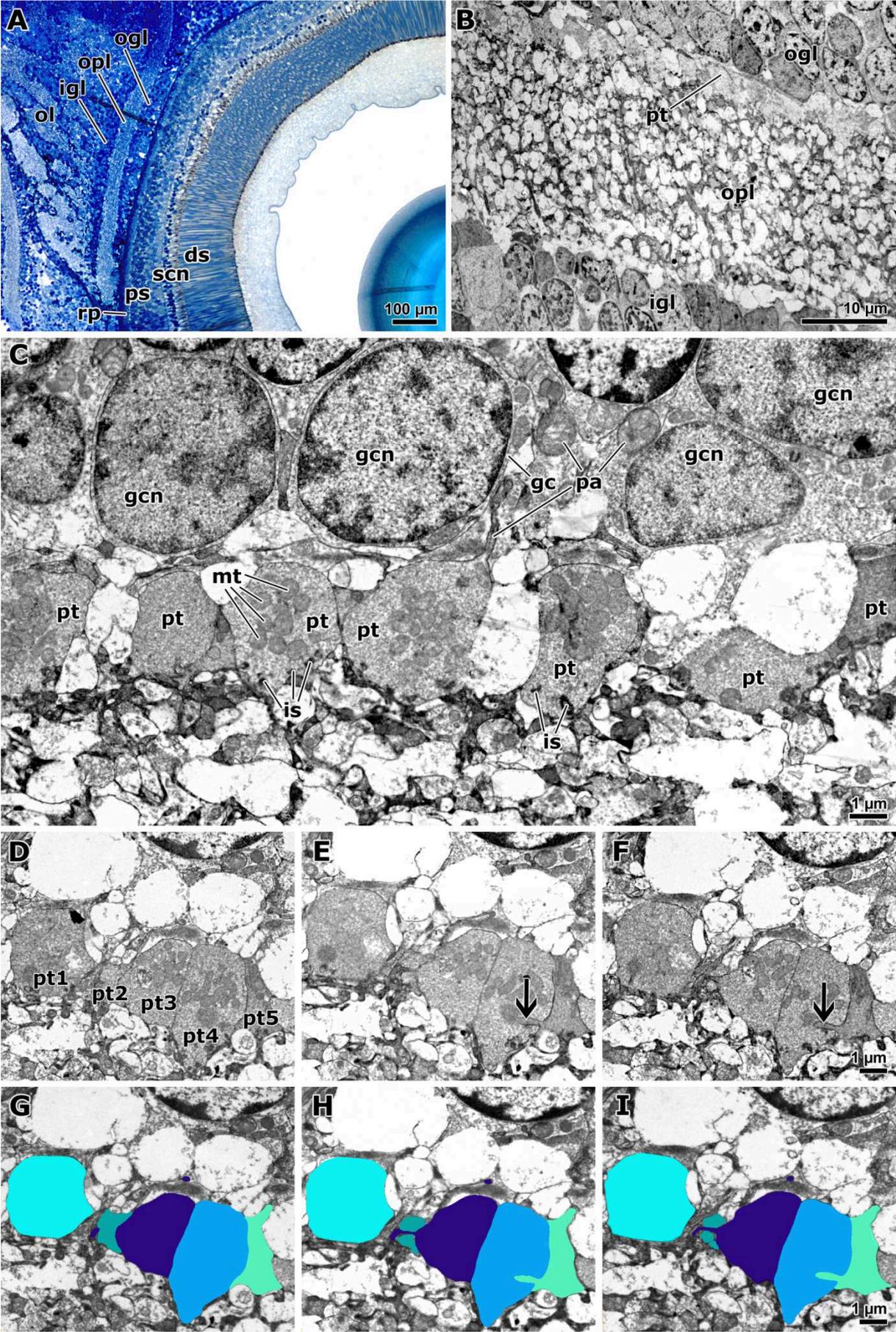
**C:** Detailbild (TEM) der äußeren Körnerschicht und der distalen äußeren plexiformen Schicht.

**D-F:** Aufeinanderfolgende Detailbilder (TEM) der Photorezeptorterminalen (pt1-5; Abstand 70 nm): der Pfeil zeigt auf fingerförmige Ausstülpung von pt5 in pt4.

**G-I:** Aufeinanderfolgende Detailbilder (TEM) der Photorezeptorterminalen 1-5, die farblich hervorgehoben sind.

**I:** 3D-Modell der Zellkerne der äußeren Körnerschicht (hellgrau transparent) und der fünf komplett rekonstruierten Photorezeptorterminalen (hellblau, türkis und lila).

**ds:** distale Segmente der Photorezeptoren, **gc:** Körnerzelle, **gcn:** Zellkern einer Körnerzelle, **igl:** innere Körnerschicht, **is:** invaginierende Synapse, **m:** Medulla, **mt:** Mitochondrium, **ogl:** äußere Körnerschicht, **ol:** optischer Lobus, **opl:** äußere plexiforme Schicht, **pa:** Photorezeptoraxon, **ps:** proximale Segmente der Photorezeptoren, **pt:** Photorezeptorterminal, **re:** Retina, **rp:** retinaler Plexus, **scn:** Zellkerne der Stützzellen.



Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus der Peripherie des optischen Lobus von *Sepia officinalis* zeigen unterschiedliche Zelltypen (Abb. 26C). In der distal gelegenen äußeren Körnerschicht können zunächst Zellkerne gesehen werden, die zu Amakrinzellen und „Sehzellen zweiter Ordnung“ gehören. Daran schließt sich eine dünne Schicht mit Zellanschnitten an, in denen kein Zytoplasma zu erkennen ist und die keinem Zelltyp zugeordnet werden konnten. Es folgen die Photorezeptorterminalen, in die die Photorezeptoraxone übergehen, und proximal davon das Neuritengeflecht, das den größten Teil der äußeren plexiformen Schicht ausmacht. In den Photorezeptorterminalen befinden sich viele ellipsoidale Mitochondrien mit einem Durchmesser von 0,2 µm bis 0,6 µm und das Cytoplasma ist mit vielen Vesikeln angefüllt, deren dichte Packung zur gleichmäßig grauen Färbung der Terminalen im elektronenmikroskopischen Bild führt. Der Verlauf der Photorezeptoraxone und die Interaktion der Photorezeptorterminalen miteinander kann anhand einzelner Bilder allein nicht erkannt werden, da diese auf mehreren aufeinanderfolgenden Schnitten liegen (Abb. 26D-F). Deshalb wurde für ein besseres Verständnis eine 3D-Rekonstruktion angefertigt. Die in Amira® rekonstruierten Photorezeptorterminalen besitzen eine rundliche bis ovale, blasige Gestalt und variieren etwas in der Größe. Aufgrund des kleinen Bildausschnitts konnten nur fünf dieser Terminalen in ihrer Gesamtheit dargestellt werden, die eine Höhe von 2,8 µm bis 4,4 µm aufweisen (Abb. 26D-I). Die „Länge“ schwankt zwischen 2,2 µm und 5,6 µm, während

---

**Abbildung 27: 3D-Rekonstruktion der Retina profunda von *Sepia officinalis* (ssTEM).** ▶

**A:** „distale“ Ansicht der Retina profunda. Zellkerne der äußeren Körnerschicht dunkelgrau transparent, Photorezeptorterminalen blau-türkis-lila, weitere Zellen hellgrau.

**B:** „proximale“ Ansicht der Retina profunda. Zellkerne der äußeren Körnerschicht dunkelgrau, Photorezeptorterminalen blau-türkis-lila, weitere Zellen hellgrau.

**C:** Photorezeptorterminalen von „distal“, 2-6 opak dargestellt, der Rest transparent. Die Axone von 2-6 ziehen in einem Bündel durch die äußere Körnerschicht, bevor sie sich auf die einzelnen Terminalen aufspalten.

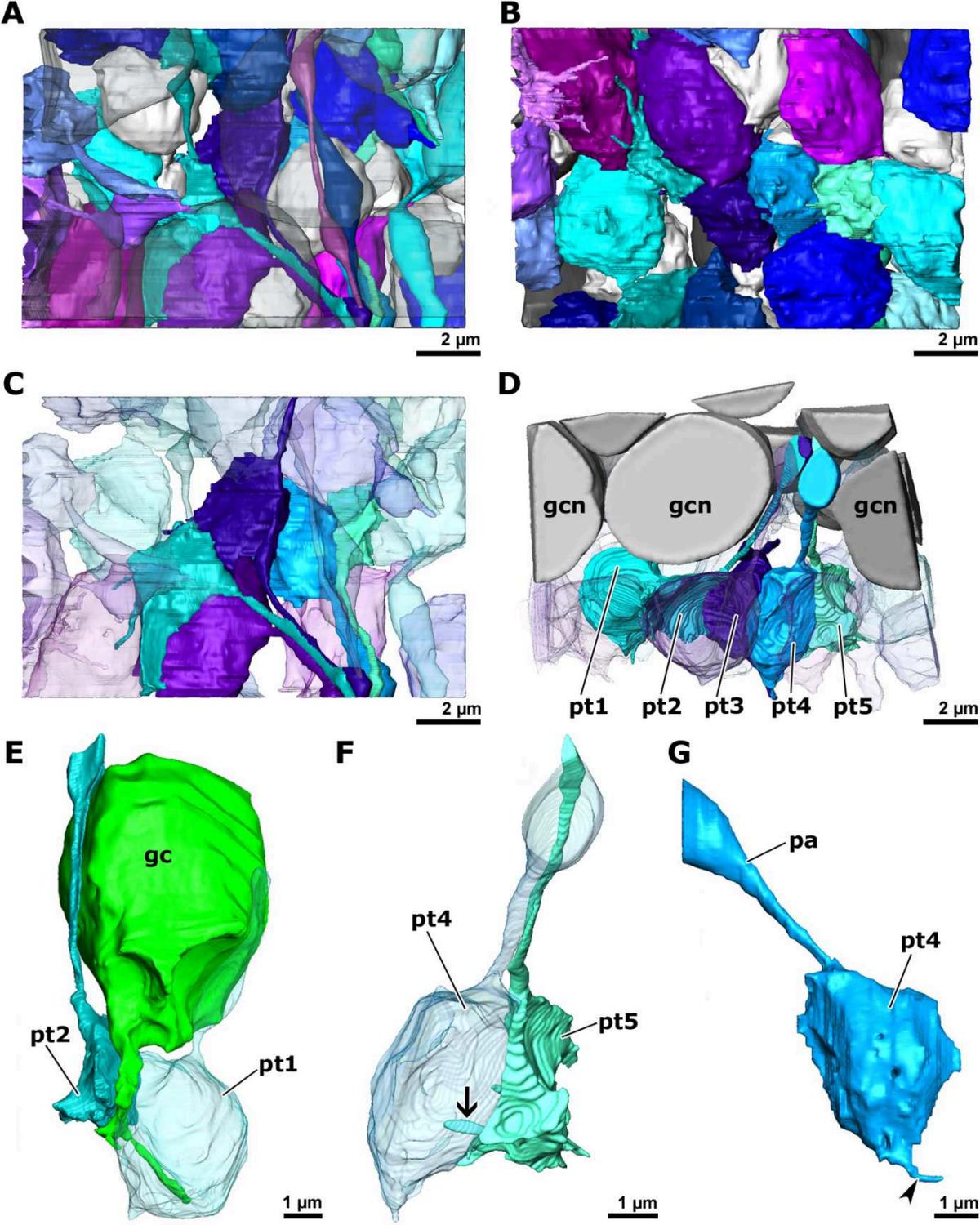
**D:** Photorezeptorterminalen von „lateral“, 1-5 opak dargestellt, der Rest transparent, Zellkerne der äußeren Körnerschicht dunkelgrau.

**E:** 3D-Modell zweier benachbarter Photorezeptorterminalen (pt1 + pt2) und einer Zelle der äußeren Körnerschicht, die ihren Ausläufer zwischen die beiden Photorezeptorterminalen sendet.

**F:** 3D-Modell zweier benachbarter Photorezeptorterminalen (pt4 + pt5): die rechte (türkis) sendet eine fingerförmige Ausstülpung (Pfeil) in die linke (hellblau transparent).

**G:** 3D-Modell der Photorezeptorterminale pt4, die Pfeilspitze deutet auf den tiefer in die äußere plexiforme Schicht führenden Fortsatz hin.

**gc:** Körnerzelle, **gcn:** Zellkern einer Körnerzelle, **pa:** Photorezeptoraxon, **pt:** Photorezeptorterminale.



die „Breite“ Werte zwischen 1,5  $\mu\text{m}$  und 3,4  $\mu\text{m}$  einnimmt. Außerdem wurden neunzehn weitere Photorezeptorterminalen partiell rekonstruiert, die nur zum Teil im Probevolumen lagen (Abb. 27A+B). Sie liegen in einer regelmäßigen Organisation dicht beieinander (Abb. 27A+B) und Invaginationen zwischen Nachbarterminalen weisen auf strukturelle (und funktionelle?) Zellinteraktionen hin. Eine solche fingerförmige Ausstülpung einer Terminale in die benachbarte Terminale ist bei den komplett rekonstruierten Terminalen dargestellt (Abb. 26E+F:  $\rightarrow$ ; 26H+I, 27F:  $\rightarrow$ ). Sie ist komplett nur auf zwei Schnitten zu sehen, 860 nm lang und 150 nm dick. Teilweise deutet sich an, dass die Photorezeptorterminalen auch Fortsätze aufweisen, die tiefer in die plexiforme Schicht reichen (Abb. 27G:  $\blacktriangleright$ ). Diese verlieren sich jedoch rasch im Neuritengeflecht und konnten somit nicht weiterverfolgt werden.

Die Zellen der äußeren Körnerschicht senden Neuriten in die äußere plexiforme Schicht aus, die zwischen den Photorezeptorterminalen verlaufen und sich verzweigen (Abb. 27E). Die Photorezeptoraxone konnten auf ihrem Weg zwischen den Zellen der äußeren Körnerschicht hindurch aufgrund des kleinen Ausschnitts nur teilweise dargestellt werden (Abb. 27). Sie sind in ihrem dargestellten Verlauf zwischen den Zellen der äußeren Körnerschicht nicht gleichmäßig gestaltet, sondern nehmen unterschiedliche Dicken an. Dabei liegen sie stellenweise nur als schmale abgeflachte Fasern vor, um sich dann wieder zu verdicken. Dies geschieht wohl je nach zur Verfügung stehendem Platz, der ihnen zwischen den Amakrinzellen und Sehzellen zweiter Ordnung bleibt, wobei die verdickten Abschnitte der Axone mit Mitochondrien angefüllt sind (Abb. 27G). Nebeneinander verlaufende Axone münden dann am distalen Rand der plexiformen Schicht auch in nebeneinander liegende Photorezeptorterminalen (Abb. 27C+D).

---

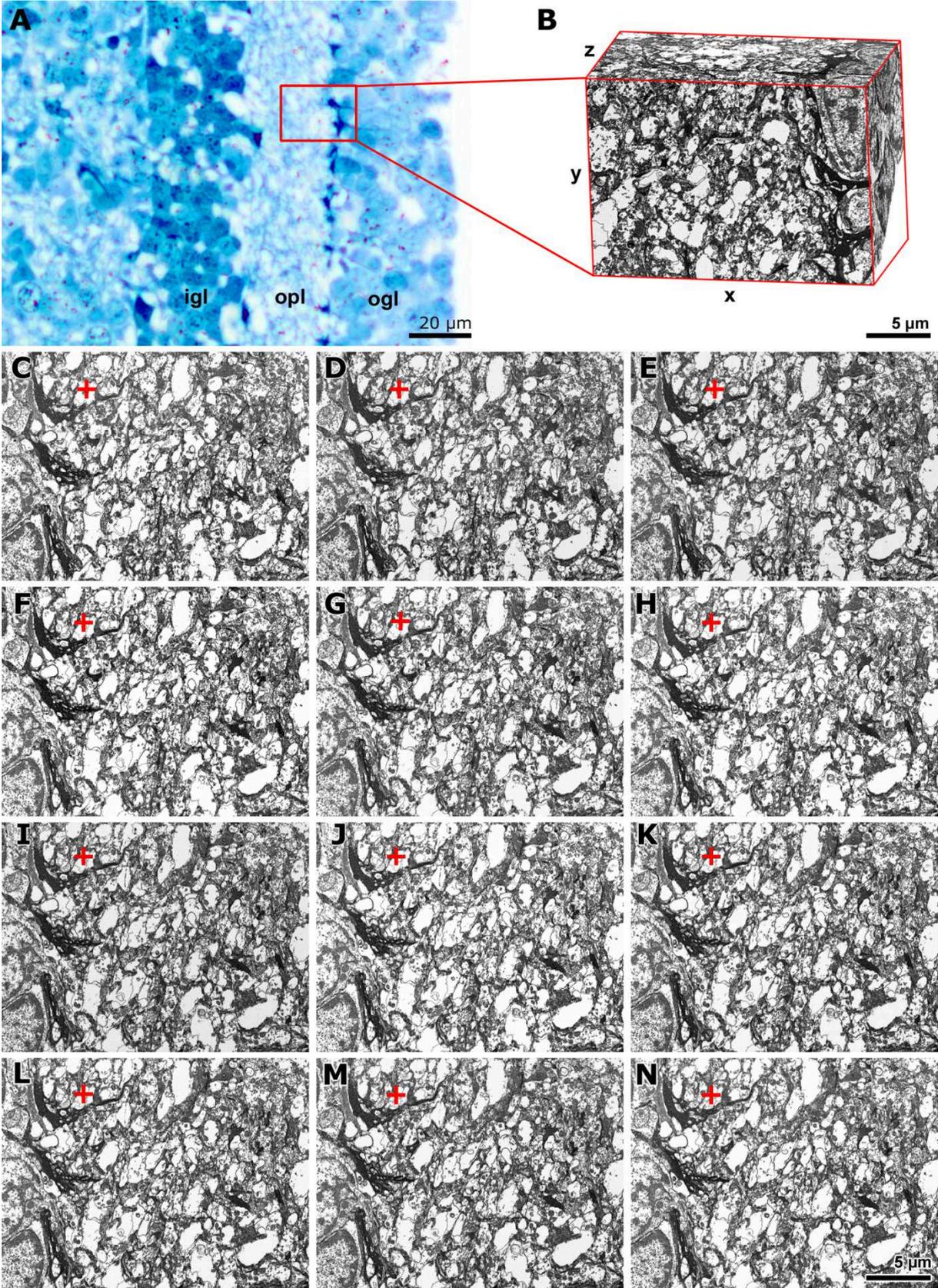
**Abbildung 28: FIB-FESEM gestützte Strukturdatenerfassung aus der äußeren plexiformen Schicht von *Sepia officinalis* und kleine Auswahl der daraus entstandenen Bilderserie.**  $\blacktriangleright$

**A:** Lichtmikroskopisches Übersichtsbild des optischen Lobus mit dem Bereich, der für FIB-FESEM verwendet wurde.

**B:** 3D-Bilderstapel mit scharfen xz- und yz-Projektionen aufgrund des guten Alignments.

**C-N:** Kurze Bildserie mit einer Auflösung von  $12 \times 12 \times 24 \text{ (nm}^3\text{)}$ , das Plus deutet jeweils auf dieselbe Stelle.

**igl:** innere Körnerschicht, **ogl:** äußere Körnerschicht, **opl:** äußere plexiforme Schicht.



### 3.3.2 FIB-FESEM

Der am Blockface-Raster-EM entstandene, praktisch verzerrungsfreie Bilderstapel konnte nach geringfügigem post-Alignment in Amira® sofort manuell segmentiert werden. Durch die geringe Schnittdicke (24 nm) treten zwischen den Schnittbildern nur geringe Veränderungen auf, wie man an dem kleinen Ausschnitt der Serie erkennen kann (Abb. 28C-N). Die Auflösung der Bilder ist mit 12 nm/px zwar fast genauso gut wie die der für 3.3.1. verwendeten TEM-Bilder (9,8 nm/px), die Strukturdetails der Photorezeptorterminalen lassen sich hier jedoch nur schwer ausmachen. Dies liegt daran, dass viele davon als fast komplett ebenmäßig schwarze Strukturen zu sehen waren (Präparationsartefakt). Auch die Grenzen zwischen den Terminalen waren deshalb schwieriger zu erkennen, weswegen die interterminalen Kontaktstellen hier nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Außerdem kann über das Cytoplasma und darin enthaltene Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, keine Aussage getroffen werden. Durch die dunkle Färbung konnten dafür die tiefer in die plexiforme Schicht reichenden Fortsätze der Photorezeptorterminalen weiter verfolgt werden.

---

**Abbildung 29: FIB-FESEM gestützte 3D-Rekonstruktion der Photorezeptorterminalen von *Sepia officinalis*.** ►

**A:** „distale“ Ansicht der Retina profunda. Zellkerne der äußeren Körnerschicht dunkelgrau transparent, Photorezeptorterminalen blau-türkis-lila.

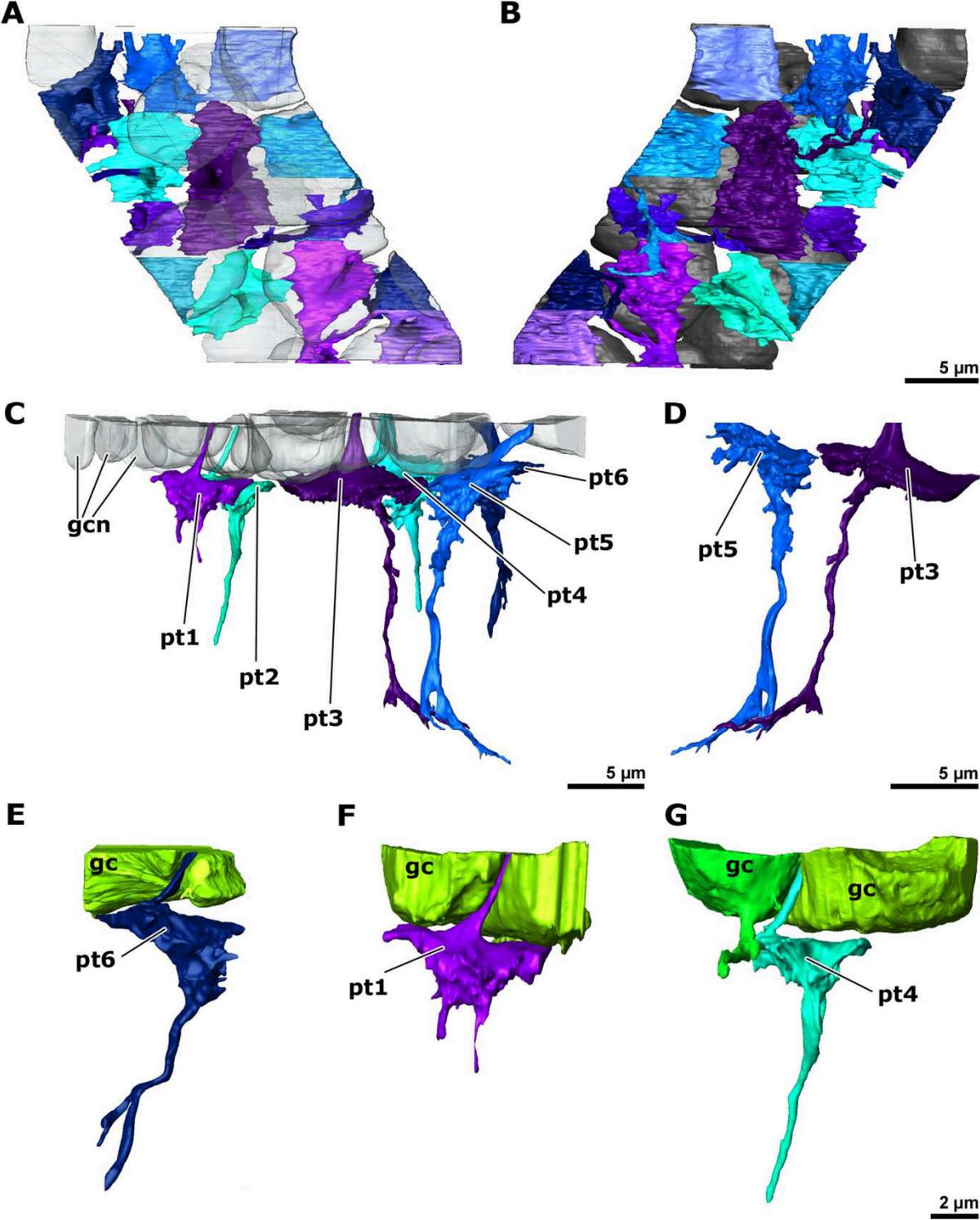
**B:** „proximale“ Ansicht der Retina profunda. Zellkerne der äußeren Körnerschicht dunkelgrau, Photorezeptorterminalen blau-türkis-lila.

**C:** 3D-Modell der Zellkerne der äußeren Körnerschicht (dunkelgrau transparent) und der sechs komplett rekonstruierten Photorezeptorterminalen pt1-6, deren Fortsätze tiefer in die plexiforme Schicht reichen.

**D:** 3D-Modell zweier benachbarter Photorezeptorterminalen (pt3 + pt5), deren Fortsätze sich tiefer in der plexiformen Schicht verzweigen.

**E-G:** 3D-Modelle dreier Photorezeptorterminalen (pt6, pt1 und pt4), deren Axone bei ihrem Weg durch die äußere Körnerschicht die Zellen „verformen“.

**gc:** Körnerzelle, **gcn:** Zellkern einer Körnerzelle, **pt:** Photorezeptorterminale.



Durch den leicht schräg verlaufenden Bilderstapel konnten sechs Photorezeptorterminalen in ihrer Gesamtheit rekonstruiert werden (Abb. 29C), acht weitere konnten teilweise dargestellt werden (Abb. 29A+B). Die Photorezeptorterminalen besitzen eine unregelmäßige Form und variieren stark in ihrer Größe. Dabei weist die größte Terminale eine Länge von 10,8  $\mu\text{m}$  und eine Breite von 6,3  $\mu\text{m}$  auf. Ansonsten schwankt die Länge zwischen 5,3  $\mu\text{m}$  und 7,1  $\mu\text{m}$  und die Breite zwischen 4,1  $\mu\text{m}$  und 6,2  $\mu\text{m}$ , die mittlere Höhe liegt bei 1,5  $\mu\text{m}$ . Die meisten weisen außerdem Fortsätze auf, die sich tiefer in der äußeren plexiformen Schicht verzweigen, wobei die längsten über eine Strecke von ca. 19  $\mu\text{m}$  verfolgt werden konnten (Abb. 29C+D). Dabei verlaufen die Fortsätze von benachbarten Terminalen parallel und die feinen Verzweigungen kommen sich sehr nahe (Abb. 29D). Die Photorezeptoraxone ziehen gleichmäßig dick durch die äußere Körnerschicht und münden in den Photorezeptorterminalen. Die Somata der Amakrinzellen und Sehzellen zweiter Ordnung umschließen dabei teilweise die Axone (Abb. 29E-G). Auch bilden sie manchmal Fortsätze, die bis in die Schicht der Photorezeptorterminalen verfolgt werden konnten (Abb. 29G).

---

## 4. DISKUSSION

---

### 4.1 3D-Mikroanatomie und Volumetrie des ZNS der Schlüpflinge von sechs Cephalopodenarten

#### 4.1.1 Allgemeines

Die vorliegende Arbeit liefert neue Strukturdaten zum Zentralnervensystem der Schlüpflinge von sechs coleoiden Cephalopodenarten in lichtmikroskopischer Auflösung.

Anhand der vollständigen Schnittserien durch die Kopfregion und durch die neuen Möglichkeiten der computergestützten 3D-Rekonstruktion können digitale, interaktiv manipulierbare und explorierbare 3D-Oberflächenmodelle verschiedener Neuropilabschnitte erstellt werden. Durch die Kombination dieser beiden Methoden wird eine umfassende Darstellung der Histologie und Mikroanatomie des ZNS der Cephalopoden in bisher unerreichter Detailtreue möglich. Mit freier Wahl der Schnittebene und der Perspektive am interaktiv manipulierbaren 3D-Modell werden komplexe Strukturen auf einzigartige Weise transparent gemacht und besser verstehbar als anhand ausgewählter 2D-Daten allein. Außerdem lassen sich über die digitale Morphometrie (z.B. Volumetrie) segmentierter Strukturen absolute und relative Größen einzelner Teilabschnitte des ZNS einfach bestimmen, und interspezifisch vergleichen. Anhand der Größe der Neuropile kann man die Leistungsfähigkeit und damit die biologische Bedeutung der einzelnen Loben des ZNS abschätzen (vgl. Wirz 1959; Frösch 1971; Maddock und Young 1987; Nixon und Mangold 1998). Dies lässt zusammen mit Form und Lage eine Deutung im Kontext von Evolution und Adaptation an die artspezifische Lebensweise zu.

Histologische Bilddaten basierend auf Semidünnschnitten werden für *I. notoides*, *R. macrosoma* und *S. obscura* in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, wobei für *I. notoides* die Anatomie des ZNS und die Verteilung bestimmter Neurotransmitter mittels Vibratom-schnitten (100-150 µm) bereits eingehend untersucht wurde (Wollesen et al. 2008, 2009, 2010a, 2010b, 2012a). Für die Schlüpflinge von *S. officinalis* und *L. vulgaris* werden die früheren Ansätze mit Sagittalschnitten mit einer Dicke von 7-10 µm (Frösch 1971) durch neue histologische Serien in deutlich verbesserter Auflösung erweitert. Innerhalb der winzigen Schlüpflinge können sogar Details wie die Interbrachialkommissur, die dünnen Cerebrosubradularkonnektive und die innere plexiforme Schicht im optischen Lobus von *L. vulgaris*

gefunden und verfolgt werden. Für *Octopus*-Schlüpflinge sind bis jetzt nur einige ausgewählte histologische Ebenen (Messenger 1967a; Marquis 1989) oder Vibratonschnitte (Wollesen et al. 2012b) publiziert worden. Frösch (1971) versuchte in Pseudo-3D-Skizzen die suboesophagealen Loben von Schlüpflingen in perspektivischen Zeichnungen darzustellen, jedoch mit schematisch vereinfachter Geometrie. Auch für die adulten Cephalopoden wurden solche Versuche unternommen, nämlich an den im Mittelmeer häufigen Vertretern *Octopus vulgaris* (Pfefferkorn 1915), *Loligo marmorae* (= *Alloteuthis media*: Schkaff 1914) und *Sepia officinalis* (Hillig 1912).

#### **4.1.2 Vergleichende Histologie und Mikroanatomie**

Ein Vergleich der histologischen und mikroanatomischen Befunde aus der vorliegenden Arbeit über Augen und ZNS mit bereits publizierten Daten ist teils möglich, teils aber schwierig, da Daten oft uneinheitlich, unvollständig, von wechselnder Qualität oder für bestimmte Arten überhaupt nicht vorhanden sind (Tabelle 13).

Die Augenstruktur ist innerhalb der coleoiden Cephalopoden größtenteils konstant, mit Ausnahme der Oegopsiden, die keine Cornea besitzen (Budelmann et al. 1997). Dementsprechend sind die Augen der untersuchten Schlüpflinge grundsätzlich ähnlich gebaut. Deutliche Unterschiede betreffen z.B. die Gesamtgröße der Augen, die Größe der vorderen Augenkammer, die bei *S. officinalis* und *R. macrosoma* am größten, bei *O. vulgaris* mittelgroß und bei den anderen Arten kaum wahrnehmbar ist, und die Blickrichtung. Auch die Retina folgt einem festen Bauplan, wobei die Proportionen der einzelnen Schichten variieren können. Bei *R. macrosoma* sind die distalen Segmente der Photorezeptoren vergleichsweise kurz, was wahrscheinlich eine geringe Photonenausbeute zum Schlüpfzeitpunkt zur Folge hat (vgl. Bozzano et al. 2009: *Sepioteuthis australis*). Die endgültige Länge wird oft erst später in der Entwicklung erreicht, wie an *Sepia esculenta* (Hao et al. 2010) oder *Sepiella japonica* (Yamamoto 1985) gezeigt wurde, kann aber auch im Zuge der Hell-Dunkeladaptation variieren (siehe z.B. Young 1963). Die große Menge an Pigmentkörnchen zwischen den distalen Segmenten der Photorezeptoren (*L. vulgaris*: Abb. 14 und in einem geringeren Ausmaß auch *I. notoides* und *O. vulgaris*) deutet auf eine tagaktive Lebensweise hin oder zumin-

Tabelle 13: Visualisierung und Morphometrie des ZNS der untersuchten Cephalopoden in der Literatur.

	<i>Sepia officinalis</i>	<i>Rossia macrosoma</i>	<i>Sepietta obscura</i>	<i>Idiosepius notoides</i>	<i>Loligo vulgaris</i>	<i>Octopus vulgaris</i>
<b>Histologie der Schlüpflinge</b>	Frösch (1971), Nixon und Mangold (1998), Nixon und Young (2003),  diese Arbeit	diese Arbeit	diese Arbeit	(Yamamoto et al. 2003: <i>I. paradoxus</i> )  diese Arbeit	Frösch (1971), Meister (1972): Zeichnungen  diese Arbeit	Messenger (1967a), Marquis (1989), Nixon und Mangold (1996), (Young 1965c: <i>Octopus</i> sp.)  diese Arbeit
<b>Histologie der Adulti</b>	Boycott (1961)	Nixon und Young (2003)		(Shigeno und Yamamoto 2002: <i>I. paradoxus</i> )	Young (1974), Young (1976a), Young (1976b), Young (1977), Young (1979), Messenger (1979)	Young (1962b), Young (1965d), Young (1965a), Young (1965f), Young (1971), Young (1983), Messenger (1967b), (Yamazaki et al. 2002: <i>O. ocellatus</i> ), Nixon und Young (2003)
<b>Zeichnungen von Schlüpflingen</b>	Frösch (1971)			Wollesen et al. (2010b), Wollesen et al. (2010a), (Yamamoto et al. 2003: <i>I. paradoxus</i> )		Young (1965d)
<b>Zeichnungen von Adulti</b>	Hillig (1912), Tompsett (1939), Maddock und Young (1987), Nixon und Young (2003)			Wollesen et al. (2010a), Wollesen et al. (2012a)	(Schkaff 1914: <i>L. marmorae</i> ), Young (1976a), Young (1976b) Young (1979), (Maddock und Young 1987: <i>L. forbesi</i> )	Boycott und Young (1955), Young (1962b), Young (1965a), Young (1965f), Messenger (1967a), Young (1971), Wells und Young (1972), Maddock und Young (1987), Wollesen et al. (2012b)
<b>Volumetrie der Schlüpflinge</b>	Frösch (1971), (Nixon und Mangold 1998: ref. Frösch 1971)	(Frösch 1971: <i>Rossia</i> sp.)	Frösch (1971)		Frösch (1971)	Frösch (1971), (Yamazaki et al. 2002: <i>O. ocellatus</i> )
<b>Volumetrie der Adulti</b>	Wirz (1954, 1959), Maddock und Young (1987), (Nixon und Mangold 1998: ref. Wirz 1959)	Wirz (1954, 1959)			Wirz (1954, 1959), (Maddock und Young 1987: <i>L. forbesi</i> )	Wirz (1954, 1959), Maddock und Young (1987)
<b>CLSM der Schlüpflinge</b>				Wollesen et al. (2009), Wollesen et al. (2010b), Wollesen et al. (2010a), Wollesen et al. (2012a), (Yamamoto et al. 2003: <i>I. paradoxus</i> )		Wollesen et al. (2012b)
<b>CLSM der Adulti</b>	Di Cristo et al. (2005)			Wollesen et al. (2008), Wollesen et al. (2009), Wollesen et al. (2010a), Wollesen et al. (2012a)		Di Cristo et al. (2005), Di Cristo et al. (2009)
<b>3D-Mikro-anatomie der Schlüpflinge</b>	diese Arbeit	diese Arbeit	diese Arbeit	diese Arbeit	diese Arbeit	diese Arbeit

dest auf eine Fixierung im hell-adaptierten Zustand. Der distale Teil der zweigeteilten Linse, der sich in der Ontogenie später als der proximale Teil entwickelt (Willekens et al. 1984), ist beim Schlüpfling von *O. vulgaris* noch ziemlich klein und wohl noch nicht vollständig entwickelt (Boycott und Young 1956; Budelmann et al. 1997). Dies ist deshalb so erstaunlich, weil die Entwicklungszeit nicht viel kürzer als bei den anderen Arten ist (Mangold und Boletzky 1973; Villanueva et al. 1995).

Unterschiede im Linsendurchmesser beeinflussen die erreichbare Auflösung und Empfindlichkeit, beide begünstigt durch größere Durchmesser (d.h. bei den Sepioiden und *I. notoides*). Unterschiede bei der Ausrichtung der optischen Achsen müssen vorsichtig interpretiert werden, denn Relaxierungs- und Fixierungsartefakte können nicht ausgeschlossen werden. Die leicht nach vorne gerichtete Orientierung unterstützt jedoch zumindest die Idee des binokularen Sehens, die auch bei früheren Verhaltensversuchen aufgestellt wurde (Wells 1958; Collewijn 1970). Für *Octopus vulgaris* wurde jedoch festgestellt, dass er das monokulare Sehen dem binokularen vorzieht und dabei auch noch eine individuelle Seitenpräferenz aufweist (Byrne et al. 2002; Byrne et al. 2004)

Die optischen Loben aller untersuchten Schlüpflinge bestehen aus einem Cortex mit äußerer Körnerschicht, äußerer plexiformer Schicht und innerer Körnerschicht und einer Medulla mit einem komplexen Neuropilnetz. Bei *L. vulgaris* gibt es eine zusätzliche innere plexiforme Schicht, die in Ansätzen auch bei *S. officinalis* zu sehen ist, jedoch nicht bei den anderen untersuchten Arten. Laut Young (1974) ist diese Schicht aber typisch für die Decabrachia (siehe aber Budelmann et al. 1997) und sollte somit auch bei *R. macrosoma*, *S. obscura* und *I. notoides* (siehe z.B. Wollesen et al. 2008: Fig. 2c) mehr oder weniger stark entwickelt sein. Die Struktur des Neuropilnetzes der Medulla wird in Abb. 15D verglichen: am schwächsten ist es beim Schlüpfling von *O. vulgaris* entwickelt.

Bei keinem der Schlüpflinge konnte eine „optische Drüse“ gefunden werden. Dies lässt sich einfach erklären, da es sich um ein endokrines Organ handelt, das die sexuelle Reifung kontrolliert (Wells und Wells 1959; Le Gall et al. 1988). Außerdem treten die Zellen der optischen Drüse laut Bonichon (1967) erst recht spät in der Entwicklung auf. Beim Schlüpfling von *Idiosepius notoides* hingegen sind Zellen der optischen Drüse zumindest mittels *InFMRF-*

Genexpression auffindbar (Wollesen et al. 2010b). Bei den adulten Tieren liegt diese Drüse in der Nähe des optischen Trakts und wird bei *Octopus vulgaris* durch den subpedunculaten Lobus (Young 1971; Frösch 1974) und bei *Sepia officinalis* vom dorsalen Basallobus (Boycott 1961) innerviert, wobei Le Gall et al. (1988) mittels Immunocytochemie einen weiteren Nerv aus dem olfaktorischen Lobus fanden.

Die hier beschriebenen histologischen und mikroanatomischen Befunde zum ZNS bestätigen die wenigen zu Cephalopoden-Schlüpflingen publizierten Strukturdaten (Young 1965c; Messenger 1967a; Frösch 1971; Marquis 1989; Nixon und Mangold 1996, 1998; Nixon und Young 2003; Yamamoto et al. 2003; Wollesen et al. 2010a; Wollesen et al. 2012b) grundsätzlich. Die Architektur der sub- und supraoesophagealen Massen und die Konstellation und Konnektivität ihrer Loben entsprechen dem coleoiden Design des ZNS, jedoch mit einigen artspezifischen Charakteristika. Das ZNS der Schlüpflinge oder Paralarven ähnelt schon dem adulten Zustand: auf den histologischen Schnitten können alle wichtigen Loben und die meisten der austretenden Nerven gefunden werden.

Die adult-ähnliche, wenn auch kleinere Bauweise des Nervensystems der Schlüpflinge unterstützt das selbstständige Überleben schon bevor alle Loben ganz ausdifferenziert sind (z.B. Vertikalissystem; siehe Marquis 1989: *Octopus vulgaris*; Shigeno et al. 2001a-d: Teuthidae; Yamamoto et al. 2003: *Idiosepius paradoxus*) und bevor die Anzahl der Neuronen und das Neuropilverhältnis ihren endgültigen Zustand erreicht haben (wenn dies überhaupt der Fall ist, da es bei einem immer wachsenden Tier nur einen fließenden Übergang zum Adulttier gibt: Frösch 1971). Im Vergleich zu den Schlüpflingen von *O. vulgaris* sind die Vertikalissysteme von *S. officinalis*, *I. notoides* und in einem geringeren Ausmaß auch *L. vulgaris* gut entwickelt, was nahelegt, dass komplexe kognitive Fähigkeiten bereits in diesem frühen Stadium auftreten könnten (Young 1979).

Nixon und Young (2003) vergleichen die Lateralansichten der Umriss der adulten Zentralnervensysteme von Vertretern der Großgruppen der coleoiden Cephalopoden, darunter auch *Sepia*, *Loligo* und *Octopus*. *Sepioloa* sp. repräsentiert dabei die Sepioliden und

ihr Umriss zeigt in der Tat eine gewisse Ähnlichkeit mit den Lateralansichten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Nervensysteme der Schlüpflinge von *R. macrosoma* (Abb. 17B, 18B) und *S. obscura* (Abb. 17C, 18C). Die charakteristische flache und gestreckte Form des ZNS beim adulten *Loligo* und auch das verdichtete und hohe Profil des ZNS von *Octopus* lassen sich schon bei den Schlüpflingen finden.

Der bei den Schlüpflingen beobachtete, sich vergrößernde Abstand zwischen den Buccal- und Frontalloben und zwischen den Brachial- und Pedalloben in der Reihenfolge Octopodida > Sepiida > Sepiolida > Teuthida wird auch bei den adulten Tieren so gefunden (Nixon und Young 2003). So sind die Brachiopedalkonnektive bei den Schlüpflingen von *Sepietta obscura*, *Idiosepius notoides* und *Loligo vulgaris* besonders lang. Gleichzeitig werden sie durch die im antero-ventralen Bereich sehr nahe beieinanderliegenden optischen Loben median eng zusammengedrückt. Dieser Zustand kann als einfache Konsequenz der sterischen Einschränkungen aufgrund von Platzmangel im Kopf erklärt werden, zugleich aber auch mit dem gestreckten, torpedo-förmigen Körper der nektonischen Teuthiden. Der große Schlüpfling von *Sepia officinalis* hat andererseits die kürzesten Brachiopedal- und Cerebrobuccalkonnektive der untersuchten Arten. Dies kann man als Tendenz der Gehirnzentralisierung interpretieren, was den Vorteil von schnellerer Informationsverarbeitung durch verkürzte Strecken zur Folge hat. So folgt in komplexeren Gehirnen die Verhaltensreaktion schneller auf die Reizwahrnehmung, was wiederum ein großer Vorteil bei der Jagd ist (Budelmann 1995). Generell wird eine Zentralisation auch mit einem komplexeren Verhaltensrepertoire in Verbindung gebracht (siehe auch: Wells 1958; Hanlon und Messenger 1988; Nixon und Mangold 1998; Nixon und Young 2003), was dann schließlich in der „Intelligenz“ der adulten Octopoda gipfelt. Auf der anderen Seite zeigen aber auch die Teuthiden ein hoch komplexes Schwarm- und Paarungsverhalten (Gilbert et al. 1990; Hanlon und Messenger 1996; Norman 2000). Die schwierigen Hälterungsbedingungen für diese pelagischen Tiere und die dadurch vergleichsweise wenigen Verhaltensexperimente haben wohl zu einer erheblichen Unterschätzung ihrer Intelligenz geführt (T. Wollesen, persönliche Mitteilung).

Eine Besonderheit von *Sepia officinalis* ist laut Nixon und Mangold (1998) die beim Schlüpf-ling bereits große Chromatophorenanzahl, die sich bis zum Adultus nicht mehr wesentlich vergrößert, und ein schon ausgereiftes chromatisches Verhalten (Hanlon und Messenger

1996). Dementsprechend finden wir bei dieser Art beträchtlich entwickelte Chromatophorenloben.

Der untersuchte Schlüpfling von *Idiosepius notoides* ist dem Schlüpfling von *I. paradoxus* sehr ähnlich (Yamamoto et al. 2003: Entwicklungsstadium 30), auch wenn er bereits etwas weiter entwickelt ist, da er offenbar einige Tage nach dem Schlupf fixiert wurde. Auch Wollesen et al. (2010b) stellen bei ihrer Beschreibung der Embryonalentwicklung des Nervensystems von *I. notoides* fest, dass Ontogenie und Neurogenese der beiden Arten sich ähneln. Es konnten an unserem Material in lichtmikroskopischer Auflösung ebenso keine Riesenaxone identifiziert werden, der Vertikallobus ist beim Schlüpfling von *I. notoides* im Gegensatz zu *I. paradoxus* jedoch bereits gut entwickelt. Im Unterschied zum adulten Tier von *I. paradoxus* (Shigeno und Yamamoto 2002) konnten aber eine Dorsolateralkommissur und zusätzliche olfaktorische Lobuli nicht gefunden werden. Die Schlüpflinge von *Idiosepius notoides* und *Loligo vulgaris* besitzen abweichend von den anderen untersuchten Arten außer den paarigen vorderen Trichternerven außerdem einen unpaaren mittleren Trichternerv (Young 1976b; Shigeno und Yamamoto 2002). Für andere Cephalopodenarten finden sich in der Literatur keine Hinweise auf einen entsprechenden unpaaren Nerv.

Beim Schlüpfling von *Loligo vulgaris* wurde eine Unterscheidung der vorderen suboesophagealen Masse in Präbrachial- und Brachialloben nicht vorgenommen (siehe aber Adulttier: Young 1976b) und die Kommissur, die die Subradularganglien miteinander verbindet (Young 1976b), konnte nicht gefunden werden. Der Vertikallobus ist beim Schlüpfstadium bereits deutlich zu erkennen, aber noch nicht ganz so massiv ausgebildet wie beim Adulttier (Young 1979).

Das ZNS von *Octopus vulgaris*, des einzigen Vertreters der Octobranchia in dieser Arbeit, weist einige Besonderheiten auf. Die weitfortgeschrittene Lobenkondensation zeigt sich darin, dass die Brachialloben mit den Pedalloben verschmolzen sind, so dass keine Brachiopedalkonnektive mehr vorhanden sind. Auch der obere Buccallobus ist so nahe an den unteren Frontallobus herangerückt, dass keine Cerebrobuccalkonnektive „notwendig“ sind. Eine weitere Besonderheit des zentralen Nervensystems der Octobranchia ist die Suprabrachial-

kommissur, die die beiden Hälften des Brachiallobus über den Oesophagus hinweg miteinander verbindet. Young (1971) beschreibt die Loben, die direkt hinter den oberen Buccalloben liegen, als hintere Buccalloben, die charakteristisch für die Octobranchia sind und an die sich dorsal die unteren Frontalloben anschließen. Es wird ausgeführt, dass die hinteren Buccalloben, von denen die Cerebrobrachialkonnektive ausgehen, zu den unteren Frontalloben der Decabranchia homolog sind und dass die „posterior-buccal-to-subvertical tracts“ (Young 1965d) zu den Cerebralkonnektiven, die zum Subvertikallobus führen, homolog sind. Der subfrontale Lobus ist beim Schlüpfling proportional viel kleiner als beim Adultus und somit schwer zu identifizieren. Der Vertikallobus ist beim Schlüpfling noch wenig entwickelt, es können aber schon ansatzweise am Neuropil die fünf beim Adultus beschriebenen Gyri (Boycott und Young 1955; Young 1971) erkannt werden.

Die Histologie der Augen und des Nervensystem des Schlüpflings von *Rossia macrosoma* entspricht bei gegebener Datenlage dem von adulten Tieren (Nixon und Young 2003).

#### **4.1.3 Vergleichende Volumetrie**

Die Möglichkeit der morphometrischen Bewertung von Strukturdaten (hier: Distanz- und Volumenmessungen mit Amira®) ist ein besonders leistungsfähiges Mittel/Werkzeug für die vergleichende Hirnforschung: verborgene Eigenschaften, die bei der Betrachtung der Formen nicht unmittelbar sichtbar sind, werden so objektiv zugänglich. Die Volumetriemethode, bei der die Voxel, die einem bestimmten Neuropil zugewiesen worden waren, automatisch gezählt werden, ähnelt der Punktzählmethode von Frösch (1971; siehe auch Wirz 1959), ist aber aufgrund der viel höheren Abtastfrequenz in lateraler und axialer Richtung präziser. Volumenmessungen der verschiedenen Gehirnbereiche legen zusammen mit einigen Informationen über ihre funktionelle Bedeutung (Tabelle 10) eine Diskussion im Sinne der Funktionsmorphologie und der ontogenetischen und phylogenetischen Allometrie nahe.

Bereits die Autoren früherer Studien (Wirz 1959; Frösch 1971; Maddock und Young 1987; Nixon und Mangold 1998) nahmen an, dass die Leistung der Hirnloben proportional zu ihrer gesamten oder relativen Größe ist, und führten eine entsprechende funktionale Argumentation.

Das absolute Volumen der **Perikaryamasse** (aber nicht das der gesamten Loben, wie gewöhnlich angegeben) steht für die Zellzahl, die für jeden Lobus über die gegebene mittlere Entfernung zwischen den Zellkernen geschätzt werden kann. Die Zellzahl wiederum deutet auf das Leistungsvermögen paralleler Nervenaktivität hin (z.B. müssen die Photorezeptoren der Retina mit einer entsprechenden Anzahl an Sekundärneuronen im optischen Lobus verbunden sein), aber auch auf mehr oder weniger komplexe Signalverarbeitung (d.h. das Vorhandensein von mehr oder weniger Neuronentypen in den sensorischen, motorischen und assoziativen Verschaltungen). Das **Neuropilvolumen** ist auf der anderen Seite mit der Anzahl und dem Durchmesser der Neurite korreliert, die vom Lobus abgehen oder in diesen projizieren (oder ihn einfach durchqueren), und auch mit dem Grad der Verzweigung und der synaptischen Komplexität (siehe z.B. innere plexiforme Schicht der Vertebratenretina: Koch et al. 2010: Fig. 5e).

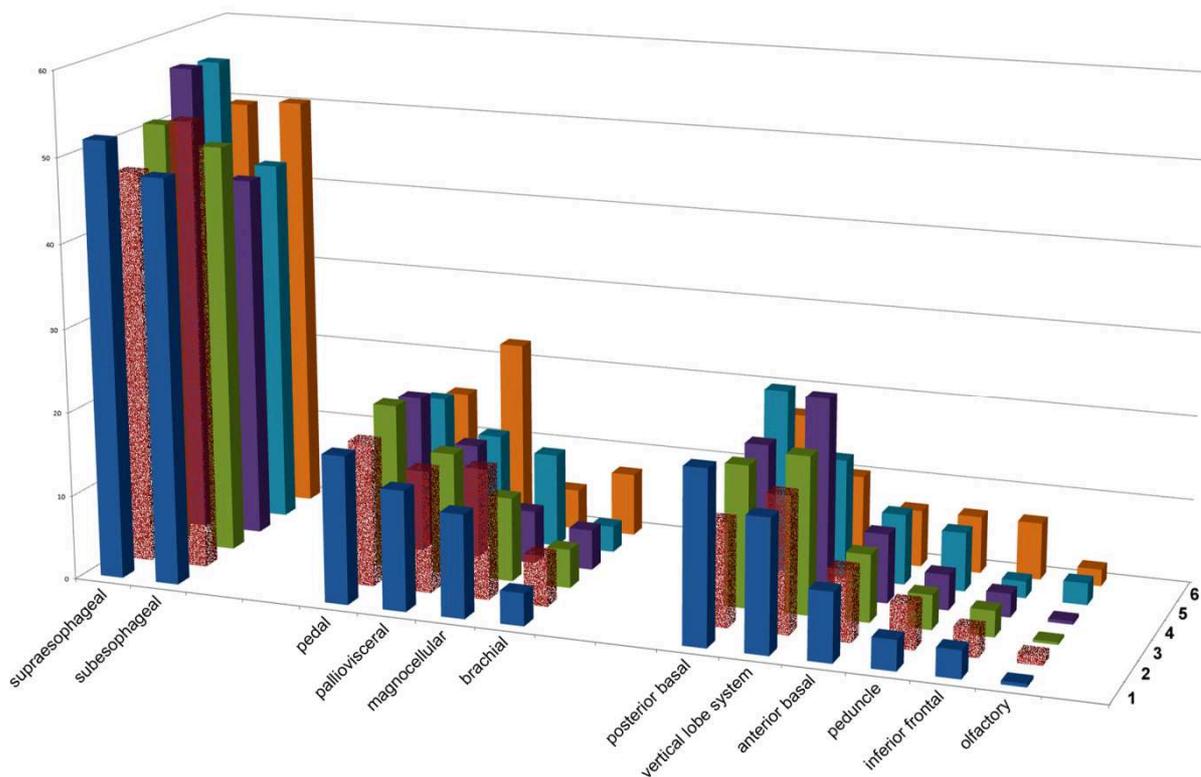
Im Gegensatz zu früheren Arbeiten (siehe Kap. 6: Anhang, Tabelle 14) haben wir uns auf die Segmentierung, Oberflächenberechnung und Volumetrie der Neuropile anstelle der ganzen Loben mit ihren Perikarya fokussiert. Dabei muss man beachten, dass die Neuropile in der Embryonalentwicklung erst ziemlich spät zwischen den Perikarya auftreten (z.B. Stadium 22 bei *I. paradoxus*: Yamamoto et al. 2003) und dass ihr Volumenanteil zum reifen Tier hin zunimmt. Beim Vergleich der **Neuropilanteilen** der sub- und supraoesophagealen Massen (Tabelle 12) der untersuchten Tiere wird eine ansteigende Abfolge von *Octopus* (30%) über *Rossia*, *Loligo*, *Sepietta* und *Sepia* (50%) sichtbar, die mit *Idiosepius* (60%) endet. Teilweise kann man eine direkte Proportionalität zwischen Schlüpfgröße (Tabelle 5) und dem Reifegrad des ZNS (mit Ausnahme von *Rossia* und *Idiosepius*) ausmachen. Für die Schlüpflinge von *R. macrosma* scheint dieser kleinere Anteil eine typische Besonderheit zu sein, das untersuchte Exemplar von *I. notooides* ist jedoch bereits weiter entwickelt.

Die Volumenzunahme der Loben des zentralen Nervensystems beim Auswachsen des Schlüpflings zum Adultus ist - generell gesehen - ein trivialer Umstand. Der Vergleich der in dieser Arbeit gewonnenen volumetrischen Daten zu Schlüpflingen mit in der Literatur publizierten Werten von juvenilen und adulten Tieren zeigt, dass es auch Unterschiede im relativen Volumen der verschiedenen Loben gibt und damit eine Umgewichtung der betref-

fenden Funktionalität in der Ontogenie. Man sollte jedoch kritisch anmerken, dass Relativwerte etwas unpräzise werden können, wenn sich die Proportionen mehrerer Anteile unabhängig voneinander verändern.

Die **absoluten Größen** von ZNS-Komponenten sind einfach mit der Körpergröße um den Schlupfzeitpunkt korreliert und diese ist wiederum über die Eigröße vorbestimmt (von den winzigen *Octopus*-Eiern zu den recht großen *Sepia*-Eiern). Unter der Annahme von gleichen und konstanten Größen für einen gegebenen Zelltyp vergrößert sich die potentielle Sehschärfe mit der **Augengröße** aufgrund einer geringeren Retinakrümmung und besserer Linsenleistung. Von der Augengeometrie in Abb. 13 (Photorezeptorzellen pro Winkel) können wir eine deutlich bessere Auflösung für *R. macrosoma* verglichen mit *O. vulgaris*, und aus Tabelle 11 ein 20-faches Volumen der optischen Loben folgern, was auf eine deutlich komplexere Informationsverarbeitung bei *R. macrosoma* hindeutet (bei ansonsten gleicher Architektur würde man bei einer 13-fachen Flächenvergrößerung der Retina eine entsprechende Vergrößerung der Fläche der äußeren plexiformen Schicht erwarten, was nicht zwangsläufig mit einer derartig starken Volumenzunahme einhergehen müsste). Der Effekt der absoluten Größen ist noch eindrucksvoller, wenn man Schlüpflinge mit Adulti vergleicht: wenn man das allometrische Wachstum der Augen von *S. officinalis* (Groeger et al. 2006) und der optischen Loben (Wirz 1959) vom Schlüpfling zum 20 cm großen Adultus betrachtet, vergrößert sich die Retinafläche / die Anzahl der sensorischen Zellen ca. 350-fach, das Volumen der optischen Loben / die Anzahl der Neuronen höherer Ordnung ca. 2100-fach. Für einen 3 mm großen Schlüpfling von *O. vulgaris* vs. einen 50 cm großen Adultus sind die Verhältnisse sogar noch drastischer.

Die **relativen Größen** der Hirnloben reflektieren zugleich ihre unterschiedliche ontogenetische Entwicklungsgeschwindigkeit, die an die artspezifischen Anforderungen an das Leben der Paralarven oder Juvenilen vorangepasst ist, und die adaptiven Abweichungen in unterschiedlichen phylogenetischen Zweigen (siehe z.B. Budelmann 1995). Deshalb sind für interspezifische Vergleiche und auch für den Vergleich von Entwicklungsstadien relative Volumenwerte sehr viel geeigneter als absolute. Während isometrisches Wachstum der neuronalen Zentren, Sensoren und Effektoren funktionelle Veränderungen nur in einem



**Abbildung 30: Graphische Visualisierung der relativen Volumenwerte (Tabelle 12).**

**1:** *S. officinalis*, **2:** *R. macrosoma*\*, **3:** *S. obscura*, **4:** *I. notoides*, **5:** *L. vulgaris*, **6:** *O. vulgaris*.

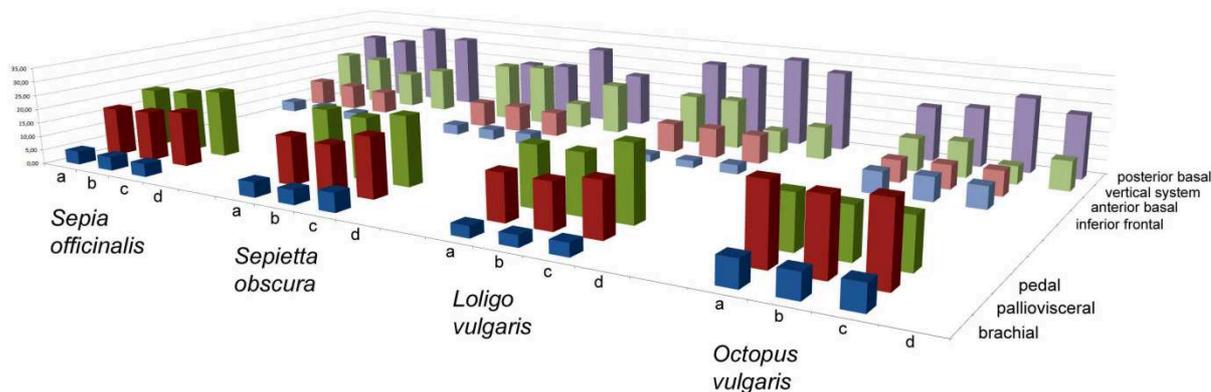
\* Werte für *R. macrosoma* sind Näherungen, siehe Tabelle 12

begrenzten Ausmaß bewirkt, deutet allometrisches Wachstum auf einen spezifischen Einfluss auf die Rechenzentren hin. Zusätzlich werden die Werte normiert, d.h. unabhängig gemacht von der Körpergröße. Der Vergleich der relativen Volumina des ZNS der untersuchten Arten lässt folgende artspezifische Merkmale, die die funktionale Organisation des Gehirns der Cephalopoden betreffen, erkennen:

Die beiden optischen Loben sind zusammen immer mindestens so groß wie das Volumen aller anderen Loben des ZNS (105% bei *O. vulgaris*, ca. 155% bei *R. macrosoma* und *L. vulgaris*, ca. 200% bei *S. officinalis* und *S. obscura*) oder bis zu dreimal so groß (338% bei *I. notoides*). Was ihr Neuropilvolumen angeht, sind die optischen Loben aufgrund der Neuropilanteile zwischen 12% und 32% weniger eindrucksvoll als das gesamte ZNS (von 45% bei *O. vulgaris* bis 135% bei *S. officinalis*). Der optische Sinn ist bei Cephalopoden dominant und rekrutiert viele Neuronen höherer Ordnung für die multiparallele Verarbeitung des neuroelektrischen Ausgangs überaus zahlreicher Photorezeptorzellen. Das Verhältnis des Volumens der optischen Loben zum Retinavolumen ist bei den drei sepioiden Arten 5 und

ungefähr 3 bei den anderen, was eine komplexere Verarbeitung der visuellen Informationen bei den Sepioiden bestätigt.

Beim Schlüpfling von *Octopus vulgaris* ist das untere Frontalsystem im Gegensatz zu den anderen Arten (Decabrachia) schon gut entwickelt. Gleiches gilt für die Brachialloben, wobei hier für *Rossia macrosoma* ein ähnlich hoher Wert vorliegt wie für *O. vulgaris*, der nicht erklärt werden kann. Diese beiden Anteile des Gehirns sind für Octopoden wegen ihres hoch entwickelten Gebrauchs der Arme sehr wichtig (Wirz 1954; Budelmann 1995). Die Palliovisceralloben machen bei den sechs untersuchten Schlüpflingen sehr unterschiedlich große Volumenanteile aus. Bei *O. vulgaris* sind sie am größten, da dieser als Schlüpfling im Plankton lebt und mehr oder weniger gut schwimmen können muss (Frösch 1971). Einen auffallend kleineren Anteil nehmen die Magnocellularloben im Gehirn des *Octopus*-Schlüpflings ein. Eine Erklärung hierfür ist, dass diese Loben bei den Decabrachia der Ursprung des Riesennervenfasersystems und somit von größerer Bedeutung sind. Innerhalb der untersuchten Decabrachia-Arten weisen die Magnocellularloben jedoch auch ziemlich auseinandergelagerte Volumenwerte auf. Bei *Rossia macrosoma* und *Idiosepius notoides* sind sie im Vergleich zu *Sepia officinalis*, *Sepietta obscura* und *Loligo vulgaris* deutlich kleiner. Daraus lässt sich schließen, dass das Riesennervenfasersystem nicht für alle Decabrachia gleich wichtig ist, zumindest im Schlüpfstadium. Die Pedalloben sind bei den fünf Arten der Decabrachia beim Schlupf bereits weiter entwickelt als bei *Octopus vulgaris*. Bei den adulten Tieren kehrt sich dieses Verhältnis um, so dass die Pedalloben bei *O. vulgaris* dann einen größeren Volumenanteil einnehmen (Maddock und Young 1987). Das Vertikalissystem ist bei den Schlüpflingen der Decabrachia besser ausgebildet als bei *O. vulgaris*, was auch bei den Adulti so bleibt (Wirz 1954, 1959; Maddock und Young 1987). Zwischen den Decabrachia-Arten bestehen im Vertikalissystem ebenfalls merkliche Unterschiede im relativen Volumen, wobei *I. notoides* das größte aufweist. Dies passt zu seiner nero-benthischen Lebensweise als Adultus (siehe Tabelle 1), da Budelmann (1995) herausfand, dass die Vertikalloben bei Flachwasserarten größer sind.



**Abbildung 31: Vergleichende Volumetrie: relative Neuropilvolumina (diese Untersuchung, Tabelle 12) vs. Lobenvolumina (Frösch 1971: Tabelle 5).**

**A:** Relative Neuropilvolumina der vorliegenden Arbeit (Tabelle 12) für die Vergleichbarkeit mit Frösch 1971 angeglichen (Tabelle 5 *ibid.*): d.h. Magnocellular-, Pedunkel- und olfaktorische Neuropile wurden vom gesamten ZNS entfernt.

**B:** Näherungen der relativen Lobenvolumina, extrapoliert aus "A" unter Berücksichtigung der sub- und supraoesophagealen Neuropilanteile von Tabelle 5.

**C:** Relative Lobenvolumina nach Frösch 1971 (Tabelle 5 *ibid.*)

**D:** Korrekturen der Lobenvolumina nach Frösch (näherungsweise), um sie an die in der vorliegenden Arbeit benutzte Gruppierung anzupassen: präkommisurale Anteile wurden der vorliegenden Arbeit entsprechend (3.03% *Sepia*, 9.26% *Sepietta*, 3.35% *Loligo*, 4.06% *Octopus*) vom hinteren Basalsystem abgezogen und zum Vertikalsystem dazugezählt.

Bei allen untersuchten Schlüpflingen sind die motorischen Zentren der Basalloben bereits gut entwickelt, was vermuten lässt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Fortbewegung der Schlüpflinge spielen (Maddock und Young 1987). Die vorderen Basalloben, die die Position und Bewegung von Kopf und Augen steuern, sind für die frischgeschlüpften Tiere besonders beim Beutefang wichtig. Auch die hinteren Basalloben spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie die Schwimmbewegungen kontrollieren.

Bei *Sepia officinalis* weisen die Neuropile der **hinteren Basalloben** und der **magnocellularen Loben** verglichen mit allen anderen untersuchten Arten ein etwas höheres Volumen auf, was auf ihre Wichtigkeit für die Kontrolle des Schwimmens und der Tarnung hinweist. Im Vergleich mit dem juvenilen und schließlich dem adulten Tier sind der **Vertikallobus** und der **obere Frontallobus** beim Schlüpfling noch relativ schwach ausgebildet (Wirz 1954; Maddock und Young 1987). Es kann aber allgemein angenommen werden, dass das gesamte Vertikalsystem bei adulten Tieren stärker ausgeprägt ist als bei Schlüpflingen von *S. officinalis*. Der Vergleich mit den Daten zu den Adulttieren von Maddock und Young (1987) zeigt, dass das untere Frontalsystem, die anterioren und die posterioren Basalloben beim Schlüpfling einen größeren Volumenanteil ausmachen. Zu den **Basalloben** findet sich bei den Volumenwerten

der beiden publizierten Untersuchungen zu den erwachsenen Tieren jedoch eine große Diskrepanz (Wirz 1954: 29,9 %; Maddock und Young 1987: 13,9 %). Da bei Wirz (1954) nicht nachvollziehbar ist, welche Gehirnteile zu den Basalloben gezählt wurden, könnte dieser große Unterschied durch eine abweichende Definition der Gehirnregionen erklärt werden. Die **suboesophageale Masse** macht beim Adulttier einen größeren Anteil aus als beim Schlüpfling (Wirz 1954; Maddock und Young 1987). Dabei sind die relativen Volumenwerte für die Brachialloben und die Visceral- gemeinsam mit den Magnocellularloben beim Schlüpfling kleiner, die für die Pedalloben jedoch größer (Maddock und Young 1987). Im Vergleich zu den Adulti nehmen die optischen Loben beim Schlüpfling einen größeren Volumenanteil ein, wobei die Volumenangaben für die Adulttiere in der Literatur aber stark schwanken (Wirz 1954; Maddock und Young 1987).

Bei *Rossia macrosoma* lassen die Proportionen von magnocellularen, brachialen und hinteren basalen Neuropilen andere motorische Prioritäten als bei *S. officinalis* vermuten. Zusätzlich zu den Augen scheint für die Schlüpflinge dieser Art die Chemorezeption besonders wichtig zu sein, da das olfaktorische Neuropil im Vergleich zu den anderen Sepioiden ein relativ großes Volumen einnimmt. Im Vergleich zum Adultus sind die Volumina der Neuropile von Brachial-, Palliovisceral- und Magnocellularloben, sowie der hinteren Basalloben des Schlüpfings von *R. macrosoma* kleiner (Wirz 1959). Das Vertikalssystem, der untere Frontallobus und auch die vorderen Basalloben nehmen beim Schlüpfling einen größeren Anteil des Gehirns ein als beim adulten Tier. Beim Neuropilvolumen der Pedalloben lassen sich nur minimale Unterschiede finden, jedoch ist der gemessene Wert beim Schlüpfling größer als beim Adultus und der geschätzte Wert kleiner, da sich hier für die Pedalloben bei einem hochgerechneten größeren Gesamtvolumen des ZNS ein geringerer prozentualer Anteil ergibt.

Bei *Idiosepius notoides* sind die Neuropile des Vertikallobus (und aller supraoesophagealen Loben zusammen) vergleichsweise gut entwickelt, was schon früh komplexe „kognitive“ Fähigkeiten vermuten lässt. Auch bei den drei Sepioiden erscheinen diese Loben (am größten bei *S. obscura*) mit einem relativen Volumen von 16-20% (und beträchtlichen absoluten Werten) recht leistungsfähig. Die magnocellularen Neuropile sind bei *I. notoides* weniger

weit entwickelt, was mit dem Fehlen der Riesennervenfasern übereinstimmt, wie es auch bei *O. vulgaris* der Fall ist.

Der Schlüpfling von *Loligo vulgaris* weist verglichen mit dem Adultus (Nixon und Young 2003) ein proportional großes Loben/Augen-Verhältnis auf, das sich auch auf die benachbarten Pedunkelloben übertragen lässt. Dafür scheint das brachiale Nervensystem beim Schlüpfling etwas weniger entwickelt zu sein. Extraokulare Photorezeptororgane konnten beim Schlüpfling nicht gefunden werden (Nixon und Young 2003). Wie bei *I. notoides* übertrifft das Volumen der supraoesophagealen Neuropile das der suboesophagealen, aber den größten Anteil machen hier die hinteren Basalloben aus, was vielleicht eine Anpassung an eine andere motorische Koordination für die pelagische Lebensweise ist. Die ziemlich riesigen Magnocellularloben entsprechen dem Vorhandensein eines Riesennervenfasersystems. Weiterhin sind die großen olfaktorischen Loben ein Hinweis für ausgeprägte Chemo-rezeption. Der Volumenanteil des **Brachiallobus** und des **Pedallobus** ist beim Schlüpfling von *L. vulgaris* im Vergleich zum Adulttier deutlich kleiner (Wirz 1959; Maddock und Young 1987). Die **vorderen** und **hinteren Basalloben** sind jedoch beim Schlüpfling stärker entwickelt als beim erwachsenen Tier (Wirz 1959; Maddock und Young 1987), wenn auch der Unterschied bei den hinteren Basalloben bei Wirz (1959) nur sehr gering ausfällt. Das Volumina des **unteren Frontalsystems** unterscheidet sich kaum vom Adultwert (Wirz 1959; Maddock und Young 1987). Bei den **Palliovisceral-** und **Magnocellularloben** und dem **Vertikalissystem** sind die Volumenwerte von Wirz (1959) und Maddock und Young (1987) für die Adulti nicht kongruent. Laut Wirz (1959) sind die Palliovisceral- und Magnocellularloben kleiner und das Vertikalissystem größer als beim erwachsenen Tier. Legt man die Werte von Maddock und Young (1987) zugrunde, verhält es sich jedoch genau umgekehrt, wobei hier der Unterschied bei den Palliovisceral- und Magnocellularloben nur sehr gering ausfällt. Die optischen Loben machen beim Schlüpfling einen deutlich geringeren Anteil gemessen am Gesamtgehirn aus als bei den Adulti, wobei auch diese Werte in der Literatur weit auseinander gehen (Wirz 1959: 268%; Maddock und Young 1987: 336%).

Die relativen Volumina der Hirnloben von *Octopus vulgaris* zeigen die Vorbereitung eines komplexen motorischen Systems des Mantels und der Armkrone sowie die chemo-taktilen Fähigkeiten dieser Art der Octobranchia (pallioviscerale, brachiale und untere frontale

Neuropile). Außerdem besitzt *Octopus* schon früh einen gut entwickelten Geruchssinn. Der Vergleich der Neuropilvolumina der vorliegenden Arbeit mit den Werten für die gesamten Loben von Frösch (1971) zeigt ähnliche Ergebnisse, wobei die letzteren oft etwas größer sind (Abb. 31 A vs. C). Dies ändert sich nicht, wenn man die Werte mit dem errechneten Neuropilanteil auf die Lobenvolumen hochrechnet (Abb. 31 B vs. C). Bei genauerem Hinsehen erkennt man, dass die Summe der einzelnen relativen Volumina von Frösch 100% leicht überschreitet. Systematische Unterschiede können in Bezug auf die hinteren Basalloben (größer bei Frösch 1971) und das Vertikalissystem (kleiner bei Frösch 1971) gefunden werden. Ein Grund dafür ist die Zuordnung der Präkommissuralloben zu den hinteren Basalloben durch Frösch. Wenn man diese Volumina jedoch dem Vertikalissystem zuweist, folgt daraus eine deutliche Abnahme der Abweichung der Werte beider Studien (Abb. 31D). Das große Volumen der Pedalloben bei *L. vulgaris* bleibt markant – möglicherweise haben diese Loben einen besonders hohen Perikaryaanteil. Beim Vergleich mit den Volumenwerten vom Adultus von *O. vulgaris* fällt auf, dass beim Schlüpfling die **Brachial-** und **Pedalloben** noch geringer entwickelt sind (Wirz 1959; Maddock und Young 1987). Die **vorderen** und **hinteren Basalloben** jedoch nehmen beim Schlüpfling einen größeren Volumenanteil ein. Beim Vertikalissystem, den unteren Frontalloben und den Palliovisceralloben mit den Magnocellularloben gehen die Angaben zu den Adulttieren so weit auseinander, dass keine klare Tendenz erkannt werden kann. Dasselbe gilt für das Volumen der optischen Loben. Als Interpretation zur Adaptation des ZNS von *O. vulgaris* an sich während der Ontogenie verändernde Anforderungen lässt sich zumindest feststellen, dass beim Schlüpfling die für das Schwimmen zuständigen Basalloben deutlich entwickelt sind, wohingegen sie beim Adultus an Bedeutung verlieren.

Allgemein kann man sagen, dass die Basalloben bei den Schlüpflingen immer einen größeren Anteil des Gesamtgehirns ausmachen als bei den Adulti. Da diese für die Motorik insbesondere beim Schwimmen zuständig sind, lässt sich daraus schließen, dass auch die benthischen Schlüpflinge zumindest beim Beutefang auf eine gute Beweglichkeit angewiesen sind. Die Brachialloben und das Vertikalissystem sind bei allen untersuchten Arten im Schlüpfstadium noch deutlich kleiner als beim erwachsenen Tier. Dies lässt sich auch eventuell dadurch erklären, dass diese Loben phylogenetisch die jüngsten sind

(Argumentation nach Frösch 1971). Alle untersuchten Arten der Decabrachia haben es gemeinsam, dass die unteren Frontalloben beim Schlüpfling ein größeres relatives Volumen einnehmen als bei den Adulti. Bei den Octobrachia ist es jedoch andersherum, da für diese die unteren Frontalloben durch den Wechsel zum benthischen Leben als taktils Sinneszentrum wichtiger werden.

#### 4.1.4 Struktur und Lebensweise

*“Structure without function is a corpse ... function without structure is a ghost”*, so bringt Wainwright (1988) die ursächliche Verflechtung von Struktur und Funktion auf den Punkt und liefert damit auch eine Begründung für die Sinnhaftigkeit funktionsmorphologischen Argumentierens. Strukturbefunde zu Nervensystemen können zu funktionellen Deutungen mit hohem Wahrscheinlichkeitsgehalt anregen, die in der Neurobiologie Anerkennung finden: so lässt sich die „Zuständigkeit“ eines ZNS-Lobus auch ohne physiologische Verifizierung aus den Projektionen zum/vom Zielorgan erschließen und die Bedeutung des entsprechenden Effektors/Sinnesorgans aus dem Volumen des Lobus abschätzen. Besonders lohnend ist diese Vorgehensweise bei interspezifisch vergleichendem Arbeiten unter Berücksichtigung von Lebensraum und Lebensweise. Prominente Beispiele hierfür sind die unterschiedliche Ausprägung des Tectum opticum bei Fischen mit unterschiedlicher Bedeutung des Lichtsinnes (Bone und Marshall 1985) oder die Proportionen von Sehnerv und Riechhirn beim Kiwi (Martin et al. 2007).

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Eidonomie der untersuchten Arten und der oben erwähnten funktionalen Schlüsse bezüglich des ZNS können einige Zusammenhänge zwischen Gehirnmorphologie und Lebensweise der Schlüpflinge abgeleitet werden (Tabelle 1), wie es auch schon Maddock und Young (1987) für adulte Cephalopoden getan haben: „the nervous system of coleoid cephalopods is organized according to a general blueprint. Though there are adaptations to environment and behavior which are reflected in the design of the central nervous system.“ Frösch (1971) sowie auch Nixon und Mangold (1996) nehmen an, dass besonders das Volumen der Hirnloben Habitat und Verhalten bis zu einem gewissen Grad reflektieren sollten. Bozzano et al. (2009) finden eine enge Beziehung zwischen der

Morphologie und der Funktion des Sehsystems bei Schlüpflingen und betonen die Wichtigkeit, dass dieses für das spätere Überleben rechtzeitig entwickelt ist.

Für eine funktionelle Deutung der interspezifischen Strukturunterschiede ist es notwendig, die „Zuständigkeiten“ der einzelnen Komponenten zu kennen. Erste Untersuchungen zur funktionellen Einteilung des Cephalopodengehirns führten Sanders und Young (1940) durch. Sie unterschieden dabei vier Typen von Zentren: (1) niedere motorische Zentren (suboesophageale Loben), (2) höhere motorische Zentren (Basalloben der supraoesophagealen Masse), (3) primäre sensorische Zentren (optische Loben) und (4) Korrelationszentren (dorsale Region der supraoesophagealen Masse). Bei seinen Experimenten mit *Sepia officinalis* fand Boycott (1961) durch elektrische Stimulation außerdem noch intermediäre motorische Zentren, die sich neben den niederen motorischen Zentren im Bereich der suboesophagealen Loben befinden. Diese Zentren zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Nerven nicht direkt die Muskeln innervieren, wie es bei den niederen motorischen Zentren der Fall ist. Budelmann et al. (1997) fassen die funktionelle Organisation des Gehirns wie folgt zusammen: Die **supraoesophagealen** Loben sind die höchsten Gehirnzentren. Davon sind das Vertikalissystem und das inferiore Frontalsystem für die Analyse von sensorischem Input, Lernen und für das Kurz- und Langzeitgedächtnis zuständig, und die Basalloben sind höhere motorische Zentren. Von den **suboesophagealen** Loben ist der Brachiallobus ein intermediäres motorisches Zentrum, die Pedal- und Palliovisceralloben beinhalten niedere und intermediäre motorische Zentren. Die Magnocellularloben sind wiederum intermediäre motorische Zentren, die zwischen den höheren und niederen motorischen Zentren vermitteln. Sie sind für das Fluchtverhalten zuständig und außerdem Ursprung des Riesenfaser-systems der Decabrachia (siehe Tabelle 10).

Am wenigsten signifikant ist wohl - im Hinblick auf die Funktion - die äußere Form des ZNS (Abb. 12), die vor allem durch die allgemeine Körperform bedingt ist. Jedenfalls gibt es Unterschiede zwischen den schlanken pelagischen Formen (*Loligo*, *Idiosepius*) und den kompakten benthischen Formen (*Sepia*, *Rossia*), wobei die sterischen Anforderungen der Augen und der optischen Loben eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen (z.B. *Rossia* vs. *Sepietta*; Abb. 12). Schon recht früh erinnern die Lobenproportionen an die Situation der Adulti (z.B. der winzige Schlüpfling von *Octopus* zeigt bereits die für Octobrachia typische

Zentralisation), aber die Form des ZNS wird sich während der Ontogenie mit der sich verändernden Gewichtung der Funktionalitäten ändern. In der Regel nehmen die relativen Größen der Brachial- und Vertikalloben zu, wohingegen die basalen und manchmal die optischen Loben bei den Schlüpflingen größer sind (Wirz 1954; Maddock und Young 1987; Nixon und Mangold 1998).

Die Gesamtgröße des ZNS ist mit der Lebensweise über die Körpergröße korreliert. Die kleinen planktonischen Schlüpflinge von *Octopus* sind mit allen Gehirnregionen ausgestattet, die für ihr anschließendes benthisches Leben wichtig sind, aber mit vergleichsweise wenigen Zellen proportional zu der noch geringen Anzahl der mit ihnen verbundenen sensorischen und effektorischen Zellen. Das planktonische Stadium benötigt nur wenig Rechenleistung, z.B. für Armbewegungen oder die Kontrolle der Chromatophoren. Für eine Weile driftet es passiv und ist lecithotroph, was strukturell durch die kurzen Arme und den noch verbleibenden äußeren Dottersack des untersuchten Exemplars reflektiert wird (Abb. 11). Nichtsdestotrotz muss das Nervensystem beim Übergang zur endgültigen benthischen Lebensweise für das Schwimmen, Krabbeln, Verstecken, Tarnen und visuelle Jagen gut vorbereitet sein. Im Gegensatz dazu können große Schlüpflinge sich bereits vor Räubern verstecken (Tarnung, Eingraben, Fliehen) und fast sofort nach dem Schlupf selbstständig fressen (Wells 1958; Poirier et al. 2004). Nachdem die Dotterreserven aufgebraucht sind, jagen und fressen sie aktiv, was eine visuelle Beuteerkennung, Kontrolle der Körperhaltung und Koordination aller beteiligten Muskelgruppen erfordert (Maddock und Young 1987). Hierbei spielen die vorderen Basalloben für die Kopf- und Augenbewegungen und die hinteren Basalloben für das Schwimmen eine wichtige Rolle. Alle diese Fähigkeiten müssen während der Embryogenese schon angelegt sein, auch wenn sie in der gut geschützten Eihülle noch nicht lebensnotwendig sind.

Der Schlüpfling der Cephalopoden mit der am besten bekannten Lebensweise ist *S. officinalis* mit einem adultähnlichen Verhaltensrepertoire (Hanlon und Messenger 1996; Nixon und Mangold 1998). So kann er schon schwimmen, seine Tentakel benutzen und sich dem Hintergrund anpassen (Hanlon und Messenger 1996). Die Augen, Statocysten und Armnerven sind bereits gut entwickelt, da die frisch geschlüpften Sepien sich bereits orientieren

und ihre Beute visuell detektieren und erkennen müssen (Nixon und Mangold 1998). Die Schlüpflinge dieser Art sollten also eine vergleichsweise scharfe Sehkraft mit komplexer Bildverarbeitung, gute Schwimffähigkeiten und Tentakelkoordination, und eine hintergrundkorrelierte Chromatophorenkontrolle für effektive Tarnung besitzen. Sie sind von Beginn an bodenbewohnend, können aber auch gut schwimmen, wobei sie vor allem nachts in die Wassersäule aufsteigen (Hanlon und Messenger 1988). Dieses kurzzeitige benthopelagische Verhalten könnte erklären, warum die Basalloben zum Schlupfzeitpunkt bereits gut entwickelt sind.

Bezüglich der anderen hier untersuchten Sepioiden scheinen ähnliche Annahmen zulässig, da sie gleichermaßen große Schlüpflinge haben, die sich sogar noch weniger von den Adulten unterscheiden (Boletzky 1974), da sie nicht so stark wachsen wie *Sepia*. Einige Einschränkungen, die die Navigation betreffen, sind der kryptischeren Lebensweise geschuldet. Bei *R. macrosoma* sind gute Sehkraft (große Augen, großes Verhältnis von optischen Loben zu Retina), differenzierte Armkoordination (große Brachialloben) und Geruchssinn (vergleichsweise große olfaktorische Neuropile) vorhanden.

Auch *S. obscura* schlüpft mit großen Augen und großen optischen Loben und ihre pedalen Neuropile sind leicht überdurchschnittlich entwickelt. Wie *R. macrosoma* hat diese Art eine benthische Lebensweise mit Eingrabverhalten und visueller Jagd, was komplexe motorische Fähigkeiten und gute Sehkraft erfordert.

Nach dem Schlüpfen begibt sich *I. notoides* in die Wassersäule, wenn er nicht gerade an Seegras angeheftet ist (Boletzky 2003; Yamamoto et al. 2003). Sein gut entwickeltes Sehsystem mit auffälliger äußerer plexiformer Schicht gibt Hinweise für ein hochentwickeltes Sehvermögen mit übergeordneter visueller Verarbeitung im Vertikallobus (oder sogar Lern- und Gedächtnisleistungen), sowie guten motorischen Fähigkeiten. In diesem Entwicklungsstadium spielen die Arme für die Jagd wahrscheinlich eine dominante Rolle, bis die Tentakel vollständig entwickelt sind.

Beim holopelagischen *L. vulgaris* findet man ausgeprägte hintere basale Neuropile und Pedunkelneuropile für die Koordination der Schwimmbewegungen, Farbwechsel und Tintenausstoß (Tabelle 10), wohingegen die Brachialloben weniger entwickelt sind. Die Armmotorik scheint eine vergleichsweise weniger wichtige Rolle zu spielen und neben dem

guten Sehvermögen scheint der Geruchssinn wichtig zu sein (große olfaktorische Neuropile). Das Vorhandensein von dichtem dunklem Schirmpigment in der Retina der Schlüpflinge von *L. vulgaris* und *O. vulgaris* passt zum tagaktiven pelagischen Leben.

Die Schlüpflinge von *O. vulgaris* sind die ersten Wochen nach dem Schlupf planktonisch, womit sie für ihre Verbreitung sorgen (Frösch 1971; Villanueva et al. 1995). Die volumetrischen Daten legen nahe, dass die Photorezeption und die zentrale Verarbeitung der visuellen Informationen während dieser Phase eine untergeordnete Rolle spielen, wohingegen der Geruchssinn, die motorische Kontrolle der Arme und des Mantels und die Verarbeitung der chemo-taktilen Informationen auf der neuroanatomischen Seite gut vorbereitet sind, da besonders die Fortbewegung und das Fressen für die Schlüpflinge wichtig sind (Nixon und Mangold 1996). Deswegen sind auch die anterioren und die posterioren Basalloben gut entwickelt. Das Schwimmen erfolgt meist rückwärts mittels „Jet-Antrieb“ wie bei den Kalmaren (Villanueva et al. 1995; Villanueva et al. 1996), wobei der Beutefang jedoch nach vorne gerichtet ist (Villanueva et al. 1996). Offensichtlich sind die unteren frontalen, brachialen und palliovisceralen Neuropile bei den Octobranchia im Gegensatz zu den untersuchten Decabranchia bereits bei den Schlüpflingen außerordentlich entwickelt (Abb. 30), um die komplexen motorischen Merkmale dieser Cephalopodengruppe zu unterstützen (Wirz 1954; Budelmann 1995).

*Octopus ocellatus* ist ein Beispiel für benthische Octopoden, deren Schlüpflinge innerhalb eines Tages nach dem Schlüpfen das nekto-benthische oder benthische Leben aufnehmen (Yamazaki et al. 2002). Das Beuteverhalten der Schlüpflinge ähnelt schon sehr dem der Adulti, das auf eine gute Koordination der Armbewegungen und Verarbeitung der taktilen Informationen angewiesen ist. Deswegen sind beim Schlüpfling die Brachialloben und auch der untere Frontallobus noch weiter entwickelt, als dies bereits beim planktonischen Schlüpfling von *O. vulgaris* der Fall ist. Außerdem ist beim Schlüpfling von *O. ocellatus* das Vertikalssystem schon besser entwickelt (Yamazaki et al. 2002) und in seinen Ausmaßen mit dem Vertikalssystem der Decabranchia vergleichbar. Vom ökologischen Standpunkt aus wäre ein Schlüpfling von *O. ocellatus* mit dem gerade niedergelassenen Jungtier von *O. vulgaris* gleichzusetzen (Yamazaki et al. 2002). Dieser Vergleich zeigt, dass sich unterschiedliches postembryonales Verhalten in den relativen Volumenanteilen der Loben widerspiegelt.

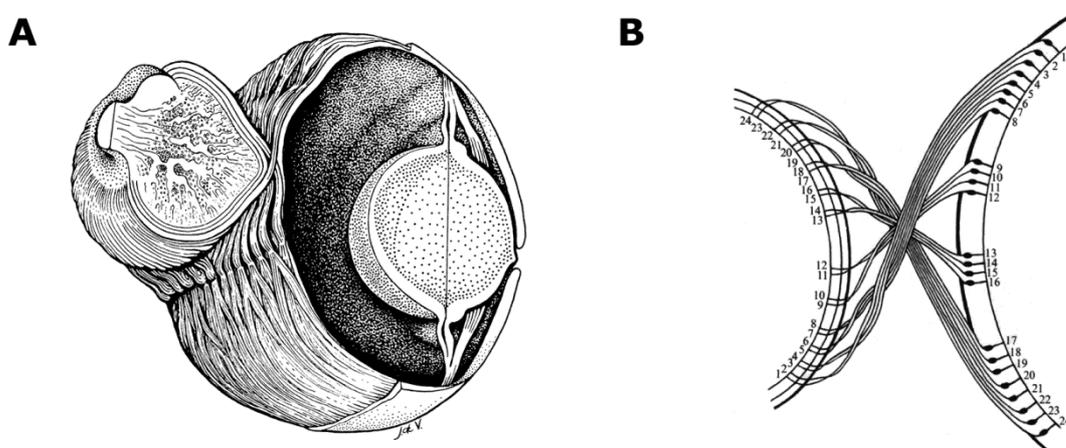
## 4.2 Retinotopie und optisches Chiasma

Da die Verrechnung der visuellen Informationen bei den Cephalopoden erst im Cortex (retina profunda sensu Young 1974) der optischen Loben stattfindet, ist es notwendig, die Photorezeptoren bis zu ihren Terminalen in der äußeren plexiformen Schicht zu verfolgen, wenn man Untersuchungen zur Retinotopie anstellen will. Zum optischen Lobus verlaufen die Axone der Photorezeptoren jedoch nicht schnurgerade (d.h. radial und auf kürzestem Weg), sondern durch ein Chiasma, das in der Literatur zum ersten Mal von Kopsch (1899) erwähnt wurde. Hierbei ziehen die Axone der dorsalen gelegenen Photorezeptoren nach ventral in den ipsilateralen optischen Lobus ein und ventrale nach dorsal, es findet aber keine Kreuzung in der anterior-posterioren Richtung statt (Stanier und Young 1955; Young 1962b, 1971). Dabei sollen die in der Mitte des Augenbeckers gelegenen Axone die kürzesten und die von der peripheren Retina kommenden die längsten sein. Stanier und Young (1955) vermuten, dass dieses Chiasma dazu dient, das durch die Linse invertierte Bild zu reinvertieren (zumindest in vertikaler Richtung), damit die visuelle Information besser mit den Informationen der nicht invertierenden Rezeptororganen, wie z.B. den Statocysten, verrechnet werden kann. Zusätzlich zum Chiasma verdrehen sich die einzelnen Nervenfasern bei der Abspaltung vom Faserbündel, um so die ursprüngliche Ordnung in der Vertikalen wiederherzustellen (Young 1971, 1974). Dieses Arrangement der Photorezeptoren innerhalb des Chiasmas ist so differenziert, dass es von adaptiver Bedeutung sein muss und durch einen sehr spezifischen Entwicklungsprozess gebildet werden muss (Young 1971). Saidel (1979) stellte mittels Cobaltdiffusion fest, dass die Photorezeptoraxone eines Nervenbündels in einer dorso-ventral orientierten keilförmigen Scheibe im Cortex des optischen Lobus terminieren. Dabei wird über das Chiasma die topographische Karte der Retina mit einer Inversion auf den optischen Lobus abgebildet (Saidel 1979; Williamson et al. 1993). Dass einzelne optische Nervenbündel in separaten Bereichen der äußeren plexiformen Schicht enden, wurde schon durch Versuche mit durchtrennten Bündeln nahegelegt, die zu scharfen Grenzen zwischen intakten und degenerierten Terminalen führten (Young 1962b).

In der Literatur finden sich meist nur Skizzen zur Organisation des Chiasmas (Abb. 32) oder wenige mikroskopische Bilder (Young 1962b, 1971; siehe Abb. 32B), bei denen der genaue Verlauf der Photorezeptoraxone nicht genau zu erkennen und höchstens angedeutet ist. Dabei werden oft exemplarisch nur wenige Photorezeptoren dargestellt, um die Über-

kreuzung im Chiasma vereinfacht zu erklären (z.B. Williamson et al. 1993: Fig. 1).

Um das Wissen um die Architektur des Chiasmas zu erweitern und in diesem Zuge die kürzesten Photorezeptoraxone mit dem geradesten Verlauf durch die Überkreuzung zu finden, wurden für diese Arbeit zwei unterschiedliche Methoden erprobt. Zum ersten die 3D-Rekonstruktion der optischen Nervenbündel auf ihrem Weg von der Retina zum optischen Lobus und zum zweiten das Neurotracing mit lipophilen Carbocyaninfarbstoffen. Beide Methoden führten aufgrund der Feinheit der untersuchten Fasern nur zu mäßigen Ergebnissen.



**Abbildung 32: Das optische Chiasma der Cephalopoden in der Literatur.**

**A:** Skizze des Auges (rechts) und des optischen Lobus (links) von *Octopus vulgaris* aus Young 1962.

**B:** Skizze des Chiasmas mit sich überkreuzenden und umeinander windenden Photorezeptoraxonen bei *Octopus vulgaris* aus Young 1971.

#### 4.2.1 Histologische Verfolgung der Photorezeptoraxone im Chiasma

Mit Hilfe der beiden Semidünnschnittserien sollten die Sehnerven auf ihrem Weg zum optischen Lobus verfolgt und ihr Verlauf durch das Chiasma nachvollzogen werden. Ziel war es dabei die Stelle mit den kürzesten und möglichst geraden Photorezeptoraxonen in der Mitte des Chiasmas zu finden. Mit diesem Wissen sollten dann weitere Schlüpflinge präpariert und weiter untersucht werden. Schlüpflinge eignen sich aufgrund ihrer geringen Größe besonders für die histologische 3D-Rekonstruktion. Um den Bereich mit wenig Abweichung vom horizontalen Chiasmadurchtritt zu finden, war eine optimale Schnittorientierung besonders wichtig. Aufgrund der Krümmung des Auges, der Augenstellung zur

Körperachse und der nicht genau bekannten Position und Organisation des Chiasmas erwies sich die Durchführung aber als schwierig.

Anhand von zwei Semidünnschnittserien, jeweils mit unterschiedlicher Orientierung, wurde versucht, die Faserbündel in lichtmikroskopischer Auflösung zu rekonstruieren (s. Kap 3.2.1). Dies erwies sich als sehr zeitaufwändig und gelang nur teilweise, da die Bündel am Lichtmikroskop besonders bei ihrem Austritt aus dem Auge nur sehr schlecht voneinander unterschieden werden konnten. Dieser erfolgt laut Young (1971) durch Löcher in der Sklera, die annähernd in Reihen entlang der antero-posterioren Achse angeordnet sind und durch die die kompakten Nervenbündel ziehen. Es war erwartet worden, dass diese Löcher in der Sklera lichtmikroskopisch deutlich zu sehen und somit die einzelnen Bündel klar definiert seien. Vermutlich durch Fixierungs- und Färbeartefakte war die Sklera jedoch kaum zu erkennen und die Nervenbündel nicht besonders gut gegeneinander abzugrenzen. Auch auf ihrem Weg zum optischen Lobus konnten Bündel nur über sehr kurze Strecken verfolgt werden, da sie von den benachbarten Bündeln nur schwer zu unterscheiden waren. Bei der ersten Schnittserie mit mäßig geeigneter Schnittrichtung war zwar auf fast jedem Schnitt der Übergang von Auge zu optischen Lobus abgebildet, aber die Nervenbündel ließen sich wie schon erwähnt nur über kurze Strecken verfolgen.

Bei der zweiten Schnittserie war die Orientierung schon besser, weswegen hier die Nervenbündel zumindest in ihrem Verlauf um den optischen Lobus herum dreidimensional dargestellt werden konnte. Es trat aber hier auch das Problem auf, dass die einzelnen Bündel je näher man zum Auge kam immer schlechter unterschieden werden konnten. Für einen durchschlagenden Erfolg bräuchte man also (1) die Region, wo die Axone einigermaßen gerade zum optischen Lobus verlaufen und (2) eine alternierende Semi-Ultra-Serie. Dafür bieten sich am besten noch kleinere Schlüpflinge, wie z.B. *Octopus vulgaris*, an. Zurzeit ist eine entsprechende Semi-Ultra-Serien für eine Masterarbeit in der AG Heß/Haszprunar in Bearbeitung.

Bei den tiefer in die Medulla des optischen Lobus ziehenden Nervenfasern könnte es sich um die von Young bei *Octopus* (1962b) und *Loligo* (1974) beschriebenen Fasern der zentrifugalen Zellen handeln.

#### 4.2.2 Optimierung von Fluoreszenz-Mehrfachfärbungen

Ein großer Vorteil der als Neurotracer verwendeten lipophilen Carbocyaninfarbstoffe ist, dass sie sowohl bei lebendem (Honig und Hume 1986, 1989; Heredia et al. 1991; Thanos und Mey 1995), wie auch fixiertem Gewebe (Godement et al. 1987; Heredia et al. 1991; Snider et al. 1992; Baker und Reese 1993; Balice-Gordon et al. 1993; Zill et al. 1993; Hofmann und Bleckmann 1999) benutzt werden können. Die Verbreitung des Farbstoffes erfolgt über „laterale Diffusion“ in den Membranen der Nervenzellen, wodurch die Morphologie von vollständig gefärbten Neuronen gezeigt werden kann. Bei Lebendgewebe kommt noch ein weiterer Transportmechanismus dazu, nämlich der aktive Transport, bei dem der Farbstoff über Endocytose in Vesikel internalisiert wird (Godement et al. 1987; Honig und Hume 1989). Deswegen erfolgt die Färbung bei lebendem Gewebe mit 6 mm am Tag (Honig und Hume 1986, 1989) auch viel schneller als bei fixiertem Gewebe mit ca. 0,2 bis 1 mm am Tag (Godement et al. 1987; Balice-Gordon et al. 1993). Dabei ist zu beachten, dass die Diffusionsgeschwindigkeit bei den verschiedenen Carbocyaninfarbstoffen unterschiedlich ausfallen kann. So fanden Balice-Gordon et al. (1993) nämlich heraus, dass DiA (1 mm am Tag) schneller in fixiertem Gewebe diffundiert als Dil (0,6 mm am Tag). Da bei den verwendeten Schlüpflingen von *Sepia officinalis* wegen ihrer relativ geringen Größe nur kurze Strecken um 1 mm überwunden werden mussten, reichte eine Laufzeit von zwei Tagen aus, um die Photorezeptorterminalen in der äußeren plexiformen Schicht anzufärben (siehe Kapitel 2, tabelle 4). Längere Laufzeiten von bis zu elf Tagen brachten im Vergleich keine deutlich besseren Ergebnisse.

Die Kristalle wurden lokal begrenzt auf die Retina aufgetragen, um die Terminalen in der äußeren plexiformen Schicht im Idealfall auch lokal begrenzt sichtbar zu machen. Zur Effizienzsteigerung wurden dann Versuche mit Mehrfachfärbungen durchgeführt. Dabei war es jedoch schwierig, Dil und DiA am Stereomikroskop getrennt zu detektieren, da beide Farbstoffe bei der vorhandenen Filterausstattung mit dem mCherry-Filter aufgenommen werden mussten. In der Literatur finden sich einige Beispiele von Doppelfärbungen am Nervensystem von Vertebraten (Honig und Hume 1989; Ragnarson et al. 1992; Snider et al. 1992; Liu et al. 1995), aber nur eines für eine Dreifachfärbung (Balice-Gordon et al. 1993). Da sich die Verwendung von DiA zeitgleich mit Dil unter den gegebenen Umständen als nicht praktikabel erwiesen hatte, wurden für die weiteren Untersuchungen nur Dil und DiO zusammen ver-

wendet, da diese mit unterschiedlichen Filtern am Stereomikroskop detektiert werden. Diese beiden Neurotracer haben sich für die zweifarbige Markierung bereits bewährt (Honig und Hume 1986; Godement et al. 1987), wobei die Färbung mit DiO für gewöhnlich schwächer ausfällt und in fixiertem Gewebe gelegentlich komplett fehlschlägt (Heredia et al. 1991; Balice-Gordon et al. 1993). Auch bei den hier durchgeführten Experimenten ist das DiO-Signal weniger stark ausgeprägt als das Dil-Signal. Balice-Gordon et al. (1993) haben deshalb in Fällen, wo DiO komplett fehlschlug, erfolgreich eine Doppelfärbung mit Dil und DiA durchgeführt. Dies war aber hier wegen der vorgegebenen Hardware-Konfiguration des Stereomikroskops nicht möglich (s.o.).

Es konnten durch das Neurotracing gewisse Erfolge erzielt werden, v.a. durch die Mehrfachfärbungen konnten die Axone benachbarter Photorezeptoren auf ihrem Weg zur äußeren plexiformen Schicht verfolgt werden. Außerdem konnten die Photorezeptor-terminalen besonders gut mit Dil sichtbar gemacht werden. Es gab aber einige Probleme mit der Überstrahlung des Signals v.a. im Bereich der distalen Segmente der Sehzellen, wo die Neurotracerkonzentration sehr hoch war, wohingegen sie zur äußeren plexiformen Schicht immer weiter abnahm. Deshalb mussten überstrahlte distale Segmente in Kauf genommen werden, damit die Photorezeptor-Endigungen sichtbar gemacht werden konnten. Auch wurden durch teilweise große Farbstoffkristalle ganze Photorezeptorgruppen angefärbt, da es sich während der Präparation als schwierig erwies, die mit einer Nadelspitze aufgenommenen Kristalle unter dem Stereomikroskop auf der gewünschten Stelle der Retina und in der gewollten Größe einzusetzen. Zur Optimierung zukünftiger Tracingversuche müsste die Positionierung und „Dosierung“ der Fluoreszenzkristalle verbessert werden.

Auch eine transneuronale Färbung benachbarter Photorezeptoren kann nicht ausgeschlossen werden, da auf eine Zugabe von EDTA, wie sie Hofmann und Bleckmann (1999) vorschlagen, verzichtet wurde. Verunreinigungen durch vagabundierende Kristalle wurden durch Verschließen des Auges mit einem Agarpfropfen reduziert. Außerdem wurden die Kristalle vor dem Schneiden wieder entfernt. Trotzdem wurden vereinzelt Signale an Stellen aufgenommen, die nicht gefärbt sein sollten.

Es konnte mit Erfolg gezeigt werden, dass die Photorezeptoraxone in ihrem Verlauf zur äußeren plexiformen Schicht abknicken und ein Stück um den optischen Lobus ziehen. Dieser Knick ist nicht an allen Stellen gleich stark ausgeprägt, aber es konnten leider keine ganz

geraden Durchtritte in der Mitte des Chiasmata gefunden werden. An den konfokalmikroskopischen Bildern sieht man sehr gut, wie sich die Faserbündel innerhalb der äußeren Körnerschicht aufspalten und sich schließlich zu den Terminalen am distalen Rand der äußeren plexiformen Schicht verdicken. Diese liegen in Form von kleinen Gruppen vor und besitzen ab und zu feine Ausläufer in die Medulla des optischen Lobus. Da es sich hier um sehr feine Fasern und Strukturen handelt, ist es zur weiteren Erforschung notwendig elektronenmikroskopische Untersuchungen anzuwenden.

### **4.3 3D-Feinstruktur der äußeren plexiformen Schicht**

Durch die Kombination von elektronenmikroskopischen Datensätzen mit der computer-gestützten 3D-Rekonstruktion ist es gelungen, den Terminationshorizont der Photorezeptorzellen in der äußeren plexiformen Schicht des optischen Lobus dreidimensional darzustellen. Ohne die Möglichkeit der Rekonstruktion von Ultradünnschnittserien konnte die Elektronenmikroskopie bisher nur andeutungsweise zum Wissen um die dreidimensionale Organisation des optischen Lobus beitragen (Dilly et al. 1963). Auch Cohen (1973a, b, c) weist in seinen Arbeiten zu den Photorezeptoren und ihren synaptischen Verbindungen darauf hin, dass ohne Serienrekonstruktionen die neuronalen Fortsätze nur schwer ihren Ursprungszellen zugeordnet werden können. Um das Aussehen und die Anordnung der Terminalen zu zeigen, war es also notwendig Bilderserien zu erstellen, da auf einzelnen TEM-Bildern (1) die Verbindung zwischen einer Terminale und ihrem Axon nicht zu sehen ist und (2) Zufallsebenen vorliegen, wie z.B. ein zentraler oder randlicher Anschnitt, so dass nur ein verzerrtes Bild der Terminalendimensionen wiedergeben werden kann. Um dies zu überwinden, wurden zwei elektronenmikroskopische Ansätze verwendet, nämlich ssTEM und FIB-FESEM, deren Ergebnisse hier diskutiert und verglichen werden sollen.

#### **4.3.1 ssTEM**

Um einen ersten Eindruck zur 3D-Struktur der äußeren plexiformen Schicht, v.a. im Hinblick auf Form und Anordnungsmuster der synaptischen Terminalen der Photorezeptoren zu erhalten, wurde eine kurze lückenlose Ultradünnschnittserie (137 Schnitte) angefertigt. Der entstandene 3D-Datensatz weist naturgemäß eine deutlich verbesserte Auflösung im Gegen-

satz zu den lichtmikroskopischen Versuchen (Kapitel 3.2) auf. Zur Erhöhung der Auflösung und zur Vergrößerung der Bildfläche wurden die verwendeten Schnittbilder am Elektronenmikroskop (verfügbar nur mit einer 1,3 MPx-Kamera) mittels Multi Image Alignment (MIA) aus 3\*3 Einzelbildern zusammengesetzt. Es gab aber grundsätzliche Probleme mit Bildverzerrungen, die durch elektronenoptische Abbildungsfehler, Schnittschrumpfung im Elektronenstrahl und mechanische Schnittstauchung beim Schneiden verursacht werden. Nach einigen Optimierungsversuchen konnten diese jedoch mit Hilfe der elastischen Registrierung weitgehend behoben werden. Da die Schnittbilder dafür aber voraligniert sein mussten und keine Ränder aufweisen durften, konnte nur ein verkleinerter Ausschnitt aus den aufgenommenen MIA-Bildern für die Rekonstruktion verwendet werden.

Nachdem in den bisherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Dilly et al. 1963; Case et al. 1972; Cohen 1973c; Haghghat et al. 1984) in den 60er bis 80er Jahren nur einzelne Schnittebenen durch den Cortex des optischen Lobus gezeigt wurden, ist dies das erste dreidimensionale EM-Bild dieser Zone, das je gemacht wurde.

Am elektronenmikroskopischen Bild sind die Photorezeptoraxone und –terminalen durch ihr dunkel erscheinendes Cytoplasma, das mit vielen kleinen Vesikeln angefüllt ist, zu erkennen, wie es auch schon in den früheren Untersuchungen gezeigt wurde (Dilly et al. 1963; Case et al. 1972; Cohen 1973c; Haghghat et al. 1984). Die Axone weisen dabei auf ihrem Weg zwischen den Zellen der äußeren Körnerschicht hindurch unterschiedlich große Durchmesser auf. Besonders groß werden diese in Bereichen, die stark mit Mitochondrien gefüllt sind (vgl. Cohen 1973c). Auch werden die Axone, bevor sie sich zu den Terminalen verdicken, am hier untersuchten Material erst noch einmal ganz dünn. Es konnten in diesem Bereich jedoch keine Varikositäten, wie von Case et al. (1972: Fig. 3) beschrieben, gefunden werden. Schließlich vergrößern sich die Photorezeptoraxone zu den Terminalen, den sog. präsynaptischen Taschen (sensu Dilly et al. 1963), und bilden den distalen Horizont der äußeren plexiformen Schicht. Dabei münden Photorezeptoraxone, die nebeneinander durch die äußere Körnerschicht verlaufen, auch in nebeneinander liegende Photorezeptorterminalen. Diese Tatsache, deutet – wie auch die geordnete Struktur der Photorezeptorterminalen – auf eine Regelmäßigkeit (Retinotopie) in der Verschaltung der Photorezeptoren hin (Abb. 27C+D). Um dies aber im Detail zu klären, müsste man die Terminalen über die Axone zu den proximalen Segmenten der Photorezeptoren verfolgen können, was sich durch das Chiasma der

optischen Fasern als schwierig erweist. Diese Terminalen sind beim untersuchten Material säckchenförmig und nicht wie in der Literatur beschrieben kegel- oder karottenförmig (Case et al. 1972; Cohen 1973c; Haghighat et al. 1984). Dabei fehlt beim Schlüpfling von *Sepia officinalis* v.a. der nach unten hin langsam schmaler werdende Teil. Einige der Terminalen zeigen Ansätze von tiefer in die plexiforme Schicht reichenden Fortsätzen. Diese lassen sich aufgrund der Rekonstruktion der Ultradünnschnittserie über mehrere benachbarte Schnitte hinweg verfolgen, bis sie bei der gewählten Auflösung zu dünn werden, um sicher identifiziert zu werden. Bisher war dies anhand von einzelnen TEM-Schnitten nicht möglich (Case et al. 1972; Cohen 1973c). Damit lassen sich die präsynaptischen Taschen den ersten beiden Photorezeptortypen nach Young (1962b, 1971) zuordnen, nämlich *ret 1*, die in der ersten radialen Schicht enden, und *ret 2*, die tiefer in die plexiforme Schicht reichen. Es konnten jedoch keine Photorezeptoraxone gefunden werden, die dem dritten Typ *ret 3* entsprachen und ohne eine Terminale auszubilden durch die plexiforme Schicht zogen um sich in der Medulla zu verzweigen. Auch Saidel (1979) fand in seinen Untersuchungen keine Axone des dritten Typs. Übereinstimmend können wir vermuten, dass dieser Typ bei *Sepia officinalis* nicht so häufig vorkommt und somit nicht in unserem relativ kleinen Probevolumen enthalten war oder Young (1962b, 1971) fälschlicherweise Ausläufer von zentrifugalen Zellen als Photorezeptoraxone des Typ III angesehen hat. Piscopo et al. (2007) folgerten aus ihren physiologischen Untersuchungen, dass die präsynaptischen Taschen als niederohmige Nebenschlüsse funktionieren und hier ankommende Aktionspotentiale kurzgeschlossen werden. Die *ret 2*-Photorezeptoren dienen in diesem Modell der Erregungsweiterleitung, während die *ret 1*-Zellen möglicherweise nur eine inhibitorische Funktion besitzen. Einige der Terminalen weisen fingerförmige Ausstülpungen in die Nachbarterminalen auf, wie sie schon früher (Dilly et al. 1963; Cohen 1973c; Haghighat et al. 1984) gezeigt wurden. An diese „inter-terminal contact zone“ (ITC) schließt sich laut Cohen (1973c: Fig. 9) die längere „invaginated synapse zone“ (IS) an. Diese erstreckt sich über mehrere  $\mu\text{m}$  und ist durch invaginierende Fortsätze, die in Synapsen enden, charakterisiert. Am hier untersuchten Material vom Schlüpfling von *Sepia officinalis* lassen sich zwar die invaginierenden Synapsen im proximalen Abschnitt der Terminalen finden, dieser Bereich ist jedoch nur sehr schmal im Vergleich zur o.g. ITC-Zone. Entweder ist dies ein artspezifisches Merkmal oder diese Region ist bei Schlüpflingen nicht so stark ausgeprägt wie bei Adulti.

Die Terminalen füllen den Horizont flächendeckend mit kleineren Lücken. Dilly et al. (1963) vermuten anhand ihrer Einzelschnitte, dass eine Terminale mit fünf bis sechs benachbarten Endknöpfchen in Kontakt steht, und sich so eine ungefähr hexagonale Raumaufteilung ergibt. Ein hexagonales Muster lässt sich am hier untersuchten Material nicht finden, auch wenn die Anzahl der direkt benachbarten Terminalen stimmen kann. Aber um ein aussagekräftiges Bild zu bekommen, müsste das Probevolumen größer sein.

Durch die 3D-Rekonstruktion war es möglich den zur OPL projizierenden Ausläufer einer Zelle (Sekundärneuron) der äußeren Körnerschicht zu verfolgen, die bisher auf Einzelschnitten nur gelegentlich beobachtet werden konnten (Dilly et al. 1963). In seinem Verlauf zeigt sich auch die von Cohen (1973c) als typisch beschriebene Bifurkation. Es konnten jedoch nicht mehr Zellen komplett rekonstruiert werden, da sie nur teilweise im Probevolumen liegen.

#### **4.3.2 FIB**

Die FIB-Technik (focused ion beam) hat die (3D)Elektronenmikroskopie revolutioniert und wird auch genutzt um Proben für weitere analytische Techniken vorzubereiten (z.B. Giannuzzi und Stevie 2005). Während die Hauptnutzung noch im Bereich der Halbleiterindustrie liegt, wird das FIB auch immer mehr z.B. in der Metallurgie (z.B. Gamo et al. 1984), Geologie (z.B. Wirth 2004), den Materialwissenschaften (z.B. Phaneuf 1999) und vielen anderen Gebieten verwendet. Durch die Kombination mit einem Rasterelektronenmikroskop in einem Zwei-Strahl-System (FIB-SEM) erhält man viele Vorteile für die Mikroskopie (Young und Moore 2005). In der Biologie wird diese Technik angewandt, um die innere Struktur von Proben zu visualisieren und zu analysieren (siehe z.B. Young et al. 1993; Drobne et al. 2005; Heymann et al. 2006; Knott et al. 2008; Schroeder-Reiter et al. 2009; Schroeder-Reiter und Wanner 2009; Villinger et al. 2012). So stellt die Methode des FIB-FESEM den zurzeit modernsten Ansatz zur Gewinnung von 3D-Strukturdaten in elektronenmikroskopischer Auflösung dar. Durch das schrittweise Abtragen der Schichten durch den fokussierten Ionenstrahl erhält man eine verzerrungsfreie *block-face*-Serie mit Bildern, die an TEM-Qualität heranreichen. Diese 3D-Datensätze sind in Hinsicht auf Auflösung und Alignment einmalig, die Datenbeschaffung ist jedoch auch ohne die Erstellung einer mechanischen Schnittserie zeit- und kostenintensiv. Die anschließende manuelle Segmentierung nimmt viel Zeit und Arbeit in Anspruch und auch diese Methode stößt an ihre Grenzen, wenn Zellen aus

dem Probevolumen auswandern. Ähnliche Datensätze erhält man durch die *serial block-face scanning electron microscopy* (SBFSEM) mittels eines „Heidelberger Hobels“, wobei die Schnitte hierbei mechanisch durch ein Mikrotom gefertigt werden und die entstandene Oberfläche des Präparats (*block-face*) mit einem Rasterelektronenmikroskop gescannt wird (Denk und Horstmann 2004).

Aufgrund der Verfügbarkeit der FIB-Technik und der Vorteile der Verzerrungsfreiheit und der äußerst geringen Schnittdicke wurde nochmals die gleiche Region des Cortex im optischen Lobus 3D-rekonstruiert wie im ssTEM-Ansatz, in der Hoffnung dank viel geringerer Schnittdicke und fast gleicher Auflösung im Vergleich zum TEM (siehe Tabelle 9) mehr Details der Verschaltungsgeometrie sichtbar machen zu können, was letztlich jedoch wegen der schlechteren Strukturhaltung nicht gelang.

Im Wesentlichen wurde das Gleiche gefunden, aber die Photorezeptorterminalen waren durch das elektronendichter erscheinende Cytoplasma nicht so gut voneinander zu unterscheiden wie auf den TEM-Bildern. Durch das dunkle Erscheinungsbild konnten dafür die Fortsätze der Terminalen, die tiefer in die äußere plexiforme Schicht ziehen, besser erkannt und verfolgt werden. Während diese Fortsätze bei der Ultradünnschnittserie nur bei einigen präsynaptischen Taschen gefunden werden konnten, waren sie bei der FIB-Serie bei fast allen rekonstruierten Endknöpfchen zu sehen. Somit können fast alle Photorezeptoren dem Typ *ret 2* und nur sehr wenige dem Typ *ret 1* zugeordnet werden (Young 1962b, 1971). Der Anteil der *ret 2*-Photorezeptoren ist hier demnach sehr viel höher als bei der TEM-Rekonstruktion, wo nur einige dem Typ II zugewiesen wurden. Dies lässt sich möglicherweise durch unterschiedliche Verteilungen der Typen in unterschiedlichen Bereichen des optischen Lobus erklären oder aber dadurch, dass bei der TEM-Serie nicht alle Fortsätze gefunden und rekonstruiert werden konnten. Durch die schlechtere Strukturhaltung gelang es leider nicht, das durch die TEM-Serie gesammelte Wissen über die Verschaltung der Terminalen untereinander mittels fingerförmiger Ausstülpungen auszuweiten, da diese im FIB-Ansatz nicht gefunden werden konnten. Auch konnten keine invaginierenden Synapsen festgestellt werden. Mit zusätzlicher extrem zeitaufwändiger Arbeit hätte sich das Kabelgewirr der äußeren plexiformen Schicht noch weiter analysieren lassen, was aber den zeitlichen Rahmen der Arbeit gesprengt hätte.

#### 4.4 Ausblick

Die dreidimensionale Darstellung und die volumetrische Analyse des zentralen Nervensystems von Cephalopoden-Schlüpflingen liefern verlässliche morphologische Merkmale für funktionelle Interpretationen (sogar wenn Informationen über die Lebensweise einer bestimmten Art fehlen) und für die vergleichende Arbeit an der adaptiven Radiation einer Tiergruppe in verschiedene (etho-)ökologische Nischen. Die Schlüpflinge von Cephalopoden sind voradaptiert an die Anforderungen ihres Habitats und die Feinabstimmung spiegelt sich in den morphologischen Unterschieden der Augen, optischen Loben und der verschiedenen Neuropile wider. In Zukunft kann dieser Ansatz durch gleichbleibende Segmentierung der Loben in Neuropil- und Perikaryaanteile (oder sogar Einzelzellzählung: siehe z.B. Heß 2007) und bei der Nutzung schnellerer Rohdatenbeschaffung über CLSM-Imaging oder Vibratom-schnittserien (siehe z.B. Wollesen et al. 2012b: Fig. 6+7, Unterscheidung zwischen Neuropil und Perikarya ist prinzipiell möglich) verfeinert werden, wenn eine z-Auflösung von ca. 50 µm tolerierbar ist.

Weitere Tracingversuche mit lipophilen Carbocyaninfarbstoffen an der Retina sind sicherlich lohnenswert, um durch umfangreiche Tests die gewünschte Stelle zu finden, an der die Photorezeptoraxone auf geradem Wege zum optischen Lobus ziehen. Dabei wäre es ratsam folgende Verbesserungsvorschläge zu berücksichtigen:

- Verwendung von EDTA im Sinne von Hofmann und Bleckmann (1999), um transneuronalen Färbungen (Diffusion ins benachbarte Gewebe) auszuschließen.
- Gezieltes Aufbringen von sehr kleinen Kristallen, um eine Überfärbung/-strahlung der Objekte zu vermeiden.

Des Weiteren könnten so angefärbte Schnitte, die einen geraden Verlauf der optischen Nervenfasern von der Retina zum optischen Lobus zeigen, in einem zweiten Schritt für elektronenmikroskopische Untersuchungen verwendet werden. Dazu würde z.B. ein Vibratomschnitte in Kunstharz eingebettet und anschließend eine Ultradünnschnittserie angefertigt werden, die dann als Basis für eine 3D-Rekonstruktion der Photorezeptoren von ihren distalen Segmenten in der Retina bis zu ihren Terminalen in der äußeren plexiformen Schicht des optischen Lobus dient.

Um das Wissen über die Verschaltungsgeometrie der Photorezeptorterminalen im optischen Lobus zu vergrößern, ist es unbedingt erforderlich in weiterführenden Arbeiten den Umfang des Probevolumens auszuweiten. Außerdem kann zur besseren Alignierung und Registrierung die neue Methode der elastische Rekonstruktion nach Saalfeld et al. (2012) mittels TrakEm2 im Programm Fiji verwendet werden. Für weitere Untersuchungen am FIB-FESEM werden frische, gut fixierte Schlüpflinge benötigt, um die Technik voll ausnützen zu können und Fixierungsartefakte wie am hier untersuchten Material zu vermeiden.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahamson, E. W., Fager, R. S., & Mason, W. T. (1974). Comparative properties of vertebrate and invertebrate photoreceptors. *Experimental Eye Research*, *18*, 51-67.
- Aguilar, L., Yanez, E., Flores, A., & Robles, L. J. (1993). Distribution of three retinal proteins in developing octopus photoreceptors. *Journal of Neurocytology*, *22*(6), 425-435.
- Aldred, R. G., Nixon, M., & Young, J. Z. (1978). The blind octopus, *Cirrothauma*. *Nature*, *275*(5680), 547-549.
- Allen, J. J., Mäthger, L. M., Buresch, K. C., Fetchko, T., Gardner, M., & Hanlon, R. T. (2010). Night vision by cuttlefish enables changeable camouflage. *The Journal of Experimental Biology*, *213*(Pt 23), 3953-3960.
- Amano, M., Oka, Y., Nagai, Y., Amiya, N., & Yamamori, K. (2008). Immunohistochemical localization of a GnRH-like peptide in the brain of the cephalopod spear-squid, *Loligo bleekeri*. *General and Comparative Endocrinology*, *156*(2), 277-284.
- Amoore, J. E., Rodgers, K., & Young, J. Z. (1959). Sodium and potassium in the endolymph and perilymph of the statocyst and in the eye of *Octopus*. *The Journal of Experimental Biology*, *36*, 709-714.
- Anderson, R. E., Benolken, R. M., Kelleher, P. A., Maude, M. B., & Wiegand, R. D. (1978). Chemistry of photoreceptor membrane preparations from squid retinas. *Biochimica et Biophysica Acta*, *510*(2), 316-326.
- Archer, S. N., Djamgoz, M. B. A., Loew, E. R., Partridge, J. C., & Vallerga, S. (1999). *Adaptive Mechanisms in the Ecology of Vision*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 668 pp.
- Arnold, J. M. (1967). Fine structure of the development of the cephalopod lens. *Journal of Ultrastructure Research*, *17*(5), 527-543.
- Babuchin, A. (1864). Vergleichend histologische Studien 1. Über den Bau der Cephalopodenretina. *Würzburger naturwissenschaftliche Zeitschrift*, *5*, 127-143.
- Baker, G. E., & Reese, B. E. (1993). Using confocal laser scanning microscopy to investigate the organization and development of neuronal projections labeled with dil. In B. Matsumoto (Ed.), *Methods in Cell Biology* (Vol. Volume 38, pp. 325-344): Academic Press.
- Balice-Gordon, R. J., Chua, C. K., Nelson, C. C., & Lichtman, J. W. (1993). Gradual loss of synaptic cartels precedes axon withdrawal at developing neuromuscular junctions. *Neuron*, *11*(5), 801-815.
- Beer, T. (1897). Die Accommodation des Kephelopodenauges. *Pfluegers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, *67*, 541-586.
- Bernard, G. D., & Wehner, R. (1977). Functional similarities between polarization vision and color vision. *Vision Research*, *17*(9), 1019-1028.
- Blainville, H. M. D. (1822). *De l'organisation des animaux, ou Principes d'anatomie comparée*. Paris: F. G. Levrault, 574 pp.
- Bleckmann, H., Budelmann, B. U., & Bullock, T. H. (1991). Peripheral and central nervous responses evoked by small water movements in a cephalopod. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *168*(2), 247-257.
- Boal, J. G., Shashar, N., Grable, M. M., Vaughan, K. H., Loew, E. R., & Hanlon, R. T. (2004). Behavioral evidence for intraspecific signaling with achromatic and polarized light by cuttlefish (Mollusca: Cephalopoda). *Behaviour*, *141*, 837-861.

- Boletzky, S. v., Boletzky, M. V. v., Frösch, D., & Gätzi, V. (1971). Laboratory rearing of Sepiolinae (Mollusca, Cephalopoda). *Marine Biology*, *8*, 62-87.
- Boletzky, S. v., & Boletzky, M. V. v. (1973). Observations on the embryonic and early post-embryonic development of *Rossia macrosoma* (Mollusca, Cephalopoda). *Helgolaender Meeresuntersuchungen*, *25*, 135-161.
- Boletzky, S. v. (1974). The "larvae" of Cephalopoda: A review. *Thalassia Jugoslavica*, *10*, 45-76.
- Boletzky, S. v. (1997). Developmental constraints and heterochrony: A new look at offspring size in cephalopod molluscs. *Geobios*, *30*(Supplement 2), 267-275.
- Boletzky, S. v. (2003). Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Advances in Marine Biology*, *44*, 143-203.
- Bone, Q., & Marshall, N. B. (1985). *Biologie der Fische*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 235 pp.
- Bonichon, A. (1967). Contribution à l'étude de la neurosécrétion et de l'endocrinologie chez les Céphalopodes. I. *Octopus vulgaris*. *Vie et Milieu - Life and Environment*, *18*, 27-263.
- Boycott, B. B., & Young, J. Z. (1955). A memory system in *Octopus vulgaris* Lamarck. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *143*, 449-480.
- Boycott, B. B., & Young, J. Z. (1956). The subpedunculate body and nerve and other organs associated with the optic tract of cephalopods. In K. G. Wingstrand (Ed.), *Bertil Hanström. Zoological papers in honour of his sixty-fifth birthday* (pp. 76-105). Lund, Sweden: Zoological Institute.
- Boycott, B. B., & Young, J. Z. (1957). Effects of interference with the vertical lobe on visual discriminations in *Octopus vulgaris* Lamarck. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *146*(925), 439-459.
- Boycott, B. B. (1961). The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *153*, 503-534.
- Bozzano, A., Pankhurst, P. M., Moltschaniwskyj, N. A., & Villanueva, R. (2009). Eye development in southern calamary, *Sepioteuthis australis*, embryos and hatchlings. *Marine Biology*, *156*, 1359-1373.
- Budelmann, B. U., & Young, J. Z. (1985). Central pathways of the nerves of the arms and mantle of *Octopus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *310*, 109-122.
- Budelmann, B. U., & Young, J. Z. (1987). Brain pathways of the brachial nerves of *Sepia* and *Loligo*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *315*, 345-352.
- Budelmann, B. U., & Young, J. Z. (1993). The oculomotor system of decapod cephalopods: eye muscles, eye muscle nerves, and the oculomotor neurons in the central nervous system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *340*(1291), 93-125.
- Budelmann, B. U. (1995). The cephalopod nervous system: What evolution has made of the molluscan design. In O. Breidbach, & W. Kutsch (Eds.), *The nervous system of invertebrates: An evolutionary and comparative approach* (pp. 115-138). Basel: Birkhäuser.
- Budelmann, B. U., Schipp, R., & Boletzky, S. v. (1997). Cephalopoda. In F. W. Harrison, & A. J. Kohn (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (Vol. 6A: Mollusca II, pp. 119-414). New York: Wiley-Liss.

- Bullock, T. H., & Budelmann, B. U. (1991). Sensory evoked potentials in unanesthetized unrestrained cuttlefish: a new preparation for brain physiology in cephalopods. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 168(1), 141-150.
- Byrne, K. A., Kuba, M., & Griebel, U. (2002). Lateral asymmetry of eye use in *Octopus vulgaris*. *Animal Behaviour*, 64, 461-468.
- Byrne, K. A., Kuba, M., & Meisel, D. V. (2004). Lateralized eye use in *Octopus vulgaris* shows antisymmetrical distribution. *Animal Behaviour*, 68, 1107-1114.
- Cartron, L., Dickel, L., Shashar, N., & Darmaillacq, A. S. (2013). Maturation of polarization and luminance contrast sensitivities in cuttlefish (*Sepia officinalis*). *The Journal of Experimental Biology*.
- Case, N. M., Gray, E. G., & Young, J. Z. (1972). Ultrastructure and synaptic relations in the optic lobe of the brain of *Eledone* and *Octopus*. *Journal of Ultrastructure Research*, 39(1-2), 115-123.
- Cheron, J. (1866). Recherches pour servir a l'histoire du systeme nerveux des cephalopodes dibranchiaux. *Annales des Sciences Naturelles*, 5, 1-118.
- Chichery, M. P., & Chichery, R. (1974). Histochemical study of the localization of cholinesterases in the central nervous system of *Sepia officinalis*. *Cell and Tissue Research*, 148(4), 551-560.
- Chrachri, A., & Williamson, R. (2003). Modulation of spontaneous and evoked EPSCs and IPSCs in optic lobe neurons of cuttlefish *Sepia officinalis* by the neuropeptide FMRF-amide. *European Journal of Neuroscience*, 17(3), 526-536.
- Chun, C. (1903). Über Leuchtorgane und Augen von Tiefsee-Cephalopoden. *Verhandlungen der deutschen zoologischen Gesellschaft*, 13, 67-91.
- Claes, M. F. (1996). Functional morphology of the white bodies of the cephalopod mollusc *Sepia officinalis*. *Acta Zoologica*, 77, 173-190.
- Clark, R. B. (1975). Components of the cephalopod electroretinogram. *Experimental Eye Research*, 20(6), 499-504.
- Clarke, J. L. (1867). On the structure of the optic lobes of the cuttlefish. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 157, 155-159.
- Cohen, A. I. (1973a). An ultrastructural analysis of the photoreceptors of the squid and their synaptic connections. I. Photoreceptive and non-synaptic regions of the retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 147(3), 351-378.
- Cohen, A. I. (1973b). An ultrastructural analysis of the photoreceptors of the squid and their synaptic connections. II. Intraretinal synapses and plexus. *The Journal of Comparative Neurology*, 147(3), 379-398.
- Cohen, A. I. (1973c). An ultrastructural analysis of the photoreceptors of the squid and their synaptic connections. III. Photoreceptor terminations in the optic lobes. *The Journal of Comparative Neurology*, 147(3), 399-426.
- Collewyn, H. (1970). Oculomotor reactions in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *The Journal of Experimental Biology*, 52(2), 369-384.
- Corda, D., & Shinitzky, M. (1985). Lipid fluidity of the outer segment membranes from cephalopod retina. *Experimental Eye Research*, 40(4), 575-583.
- D'Este, L., Kimura, S., Casini, A., Matsuo, A., Bellier, J. P., Kimura, H., et al. (2008). First visualization of cholinergic cells and fibers by immunohistochemistry for choline acetyltransferase of the common type in the optic lobe and peduncle complex of *Octopus vulgaris*. *The Journal of Comparative Neurology*, 509(6), 566-579.

- Darmaillacq, A. S., Lesimple, C., & Dickel, L. (2008). Embryonic visual learning in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Animal Behaviour*, *76*, 131-134.
- Darmaillacq, A. S., & Shashar, N. (2008). Lack of polarization optomotor response in the cuttlefish *Sepia elongata* (d'Orbigny, 1845). *Physiology & Behavior*, *94*(4), 616-620.
- Daw, N. W., & Pearlman, A. L. (1974). Pigment migration and adaptation in the eye of the squid, *Loligo pealei*. *The Journal of General Physiology*, *63*(1), 22-36.
- De Velasco, B., Martinez, J. M., Ochoa, G. H., Miller, A. M., Clark, Y. M., Matsumoto, B., et al. (1999). Identification and immunolocalization of actin cytoskeletal components in light- and dark-adapted octopus retinas. *Experimental Eye Research*, *68*(6), 725-737.
- Denk, W., & Horstmann, H. (2004). Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biology*, *2*(11), e239.
- Denton, E. J., & Warren, F. J. (1968). Eyes of the Histioteuthidae. *Nature*, *219*(5152), 400-401.
- Di Cristo, C., Van Minnen, J., & Di Cosmo, A. (2005). The presence of APGWamide in *Octopus vulgaris*: a possible role in the reproductive behavior. *Peptides*, *26*(1), 53-62.
- Di Cristo, C., De Lisa, E., & Di Cosmo, A. (2009). Control of GnRH expression in the olfactory lobe of *Octopus vulgaris*. *Peptides*, *30*(3), 538-544.
- Dickel, L., Chichery, M. P., & Chichery, R. (1997). Postembryonic maturation of the vertical lobe complex and early development of predatory behavior in the cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Neurobiology of Learning and Memory*, *67*(2), 150-160.
- Dietl, M. J. (1878). Untersuchungen über die Organisation des Gehirns wirbelloser Thiere (Cephalopoden, Tethys). *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien*, *77*, 481-533.
- Dilly, P. N., Gray, E. G., & Young, J. Z. (1963). Electron microscopy of optic nerves and optic lobes of *Octopus* and *Eledone*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *158*, 446-456.
- Douglas, R. H., Williamson, R., & Wagner, H. J. (2005). The pupillary response of cephalopods. *The Journal of Experimental Biology*, *208*(Pt 2), 261-265.
- Drobne, D., Milani, M., Zrimec, A., Zrimec, M. B., Tatti, F., & Drašlar, K. (2005). Focused ion beam/scanning electron microscopy studies of *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) digestive gland epithelium cells. *Scanning*, *27*(1), 30-34.
- Duncan, G., & Croghan, P. C. (1973). Electrical activity of the isolated cephalopod retina: an equivalent circuit model. *Experimental Eye Research*, *15*(3), 401-408.
- Duncan, G., & Weeks, F. I. (1973). Photoreception by a cephalopod retina in vitro. *Experimental Eye Research*, *17*(2), 183-192.
- Florey, E., & Winesdorfer, J. (1968). Cholinergic nerve endings in octopus brain. *Journal of Neurochemistry*, *15*(3), 169-177.
- Frösch, D. (1971). Quantitative Untersuchungen am Zentralnervensystem der Schlüpfstadien von zehn mediterranen Cephalopodenarten. *Revue Suisse de Zoologie*, *57*, 1069-1122.
- Frösch, D. (1973). On the fine structure of the *Octopus* iris. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, *145*(1), 119-129.
- Frösch, D. (1974). The subpedunculate lobe of the octopus brain: evidence for dual function. *Brain Research*, *75*(2), 277-285.
- Gamo, K., Takakura, N., Samoto, N., Shimizu, R., & Namba, S. (1984). Ion beam assisted deposition of metal organic films using focused ion beams. *Japanese Journal of Applied Physics*, *23*, L293-L295.

- Gervasio, A., Martin, R., & Miralto, A. (1971). Fine structure of synaptic contacts in the first order giant fibre system of the squid. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, *112*(1), 85-96.
- Giannuzzi, L. A., & Stevie, F. A. (Eds.). (2005). *Introduction to focused ion beams*. New York: Springer, 358 pp.
- Gilbert, D. L., Adelman, W. J., & Arnold, J. M. (1990). *Squid as experimental animals*. New York: Plenum Press, 516 pp.
- Gilly, W. F., Hopkins, B., & Mackie, G. O. (1991). Development of giant motor axons and neural control of escape responses in squid embryos and hatchlings. *The Biological Bulletin*, *180*, 209-220.
- Giuditta, A., Libonati, M., Packard, A., & Prozzo, N. (1971). Nuclear counts in the brain lobes of *Octopus vulgaris* as a function of body size. *Brain Research*, *25*(1), 55-62.
- Giuditta, A., & Prozzo, N. (1974). Postembryonic growth of the optic lobe of *Octopus vulgaris*, Lam. *The Journal of Comparative Neurology*, *157*(2), 109-116.
- Gleadall, I. G., Ohtsu, K., Gleadall, E., & Tsukahara, Y. (1993). Screening-pigment migration in the octopus retina includes control by dopaminergic efferents. *The Journal of Experimental Biology*, *185*, 1-16.
- Glockauer, A. (1915). Zur Anatomie und Histologie des Cephalopodenauges. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, *113*, 325-360.
- Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., & Bonhoeffer, F. (1987). A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development*, *101*(4), 697-713.
- Grable, M. M., Shashar, N., Gilles, N. L., Chiao, C. C., & Hanlon, R. T. (2002). Cuttlefish body patterns as a behavioral assay to determine polarization perception. *The Biological Bulletin*, *203*(2), 232-234.
- Gray, E. G., & Young, J. Z. (1964). Electron microscopy of synaptic structure of *Octopus* brain. *The Journal of Cell Biology*, *21*, 87-103.
- Gray, E. G. (1970). A note on synaptic structure of the retina of *Octopus vulgaris*. *Journal of Cell Science*, *7*(1), 203-215.
- Grenacher, H. (1883). Abhandlungen zur vergleichenden Anatomie des Auges. I. Die Retina der Cephalopoden. *Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft Halle*, *16*, 209-256.
- Grimaldi, A. M., Agnisola, C., & Fiorito, G. (2007). Using ultrasound to estimate brain size in the cephalopod *Octopus vulgaris* Cuvier in vivo. *Brain Research*, *5*, 66-73.
- Grobber, C. (1886). Zur Kenntniss der Morphologie und der Verwandtschaftsverhältnisse der Cephalopoden. *Arbeiten aus dem Zoologischen Institut der Universität Wien und der Zoologischen Station in Triest*, *7*, 61-82.
- Groeger, G., Cotton, P. A., & Williamson, R. (2005). Ontogenetic changes in the visual acuity of *Sepia officinalis* measured using the optomotor response. *Canadian Journal of Zoology*, *83*(2), 274-279.
- Groeger, G., Chrachri, A., & Williamson, R. (2006). Changes in cuttlefish retinal sensitivity during growth. *Vie et Milieu - Life and Environment*, *56*(2), 167-173.
- Guibé, M., & Dickel, L. (2011). Embryonic visual experience influences post-hatching shelter preference in cuttlefish. *Vie et Milieu - Life and Environment*, *61*(4), 243-246.
- Haghighat, N., Cohen, R. S., & Pappas, G. D. (1984). Fine structure of squid (*Loligo pealii*) optic lobe synapses. *Neuroscience*, *13*(2), 527-546.

- Hamlyn-Harris, R. (1903). Die Statocysten der Cephalopoden. *Zoologische Jahrbücher: Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 18, 327-358.
- Han, J. M., & Chang, N. S. (2002a). Fine structure of retinae of cephalopods (*Todarodes pacificus* and *Octopus minor*) inhabiting the Korean waters. *Korean Journal of Electron Microscopy*, 32(1), 17-30.
- Han, J. M., & Chang, N. S. (2002b). Fine structure of optic lobes of cephalopods (*Todarodes pacificus* and *Octopus minor*) inhabiting the Korean waters. *Korean Journal of Electron Microscopy*, 32(2), 131-147.
- Hanlon, R. T., & Messenger, J. B. (1988). Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L.): The morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 320, 437-487.
- Hanlon, R. T., & Messenger, J. B. (1996). *Cephalopod Behaviour*. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 232 pp.
- Hao, Z.-L., Zhang, X.-M., Kudo, H., & Kaeriyama, M. (2010). Development of the retina in the cuttlefish *Sepia esculenta*. *Journal of Shellfish Research*, 29(2), 463-470.
- Hara, T., Hara, R., & Takeuchi, J. (1967). Rhodopsin and retinochrome in the octopus retina. *Nature*, 214(5088), 572-573.
- Hara, T., & Hara, R. (1967). Rhodopsin and retinochrome in the squid retina. *Nature*, 214(5088), 573-575.
- Hara, T., & Hara, R. (1976). Distribution of rhodopsin and retinochrome in the squid retina. *The Journal of General Physiology*, 67(6), 791-805.
- Heidermanns, C. (1928). Messende Untersuchungen über das Formensehen der Cephalopoden und ihre optische Orientierung im Raum. *Zoologische Jahrbücher: Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*, 45, 609-650.
- Hensen, V. (1865). Über das Auge einiger Cephalopoden. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 15, 155-242.
- Heredia, M., Santacana, M., & Valverde, F. (1991). A method using dil to study the connectivity of cortical transplants. *Journal of Neuroscience Methods*, 36(1), 17-25.
- Hess, C. (1905). Beiträge zur Physiologie und Anatomie des Cephalopodenauges. *Pfluegers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 109, 393-439.
- Heß, M. (2007). Semi-automated mapping of cell nuclei in 3D-stacks from optical-sectioning microscopy. In P. Perner, & O. Salvetti (Eds.), *Advances in mass data analysis of signals and images in medicine, biotechnology and chemistry* (pp. 156-164, Lecture Notes in Computer Science, Vol. 4826). Berlin / Heidelberg: Springer.
- Hesse, R. (1900). Untersuchungen über die Organe der Lichtempfindung bei niederen Thieren. VI. Die Augen einiger Mollusken. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 68, 379-477.
- Heymann, J. A. W., Hayles, M., Gestmann, I., Giannuzzi, L. A., Lich, B., & Subramaniam, S. (2006). Site-specific 3D imaging of cells and tissues with a dual beam microscope. *Journal of Structural Biology*, 155(1), 63-73.
- Hillig, R. (1912). Das Nervensystem von *Sepia officinalis* L. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 101, 736-800.
- Hobbs, M. J., & Young, J. Z. (1973). A cephalopod cerebellum. *Brain Research*, 55(2), 424-430.
- Hofmann, M. H., & Bleckmann, H. (1999). Effect of temperature and calcium on transneuronal diffusion of Dil in fixed brain preparations. *Journal of Neuroscience Methods*, 88(1), 27-31.

- Honig, M. G., & Hume, R. I. (1986). Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *The Journal of Cell Biology*, *103*(1), 171-187.
- Honig, M. G., & Hume, R. I. (1989). Dil and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends in Neurosciences*, *12*(9), 333-335.
- Jagger, W. S., & Sands, P. J. (1999). A wide-angle gradient index optical model of the crystalline lens and eye of the octopus. *Vision Research*, *39*(17), 2841-2852.
- Jander, R., Daumer, K., & Waterman, T. H. (1963). Polarized light orientation by two Hawaiian decapod cephalopods. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *46*(4), 383-394.
- Jereb, P., & Roper, C. F. E. (2005). *Cephalopods of the world: An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 1. Chambered nautilus and sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae)* (FAO species catalogue for fishery purposes, Vol. 4(1)). Rome: FAO, 262 pp.
- Jereb, P., & Roper, C. F. E. (2010). *Cephalopods of the world: An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 2. Myopsid and oegopsid squids* (FAO Species catalogue for fishery purposes, Vol. 4(2)). Rome: FAO, 605 pp.
- Klein, K. (1931). Die Nervenendigungen in der Statocyste von *Sepia*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, *14*(3), 481-516.
- Knott, G., Marchman, H., Wall, D., & Lich, B. (2008). Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *The Journal of Neuroscience*, *28*(12), 2959-2964.
- Koch, P. C., Seebacher, C., & Heß, M. (2010). 3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina—A confocal and two-photon microscopic study. *Journal of Neuroscience Methods*, *188*(1), 127-140.
- Kopsch, F. (1899). Mitteilungen über das Ganglion opticum der Cephalopoden. *Internationale Monatschrift für Anatomie und Physiologie*, *16*, 33-54.
- Kröger, R. H. H., & Gislén, A. (2004). Compensation for longitudinal chromatic aberration in the eye of the firefly squid, *Watasenia scintillans*. *Vision Research*, *44*(18), 2129-2134.
- Lam, D. M., Wiesel, T. N., & Kaneko, A. (1974). Neurotransmitter synthesis in cephalopod retina. *Brain Research*, *82*(2), 365-368.
- Land, M. F. (1984). Molluscs. In M. A. Ali (Ed.), *Photoreception and Vision in Invertebrates* (Vol. 74, pp. 699-725, NATO ASI Series): Springer US.
- Lauder, G. V. (1981). Form and function: structural analysis in evolutionary morphology. *Paleobiology*, *7*(4), 430-442.
- Le Gall, S., Feral, C., Van Minnen, J., & Marchand, C. R. (1988). Evidence for peptidergic innervation of the endocrine optic gland in *Sepia* by neurons showing FMRFamide-like immunoreactivity. *Brain Research*, *462*(1), 83-88.
- Lee, Y. H., Yan, H. Y., & Chiao, C. C. (2012). Effects of early visual experience on the background preference in juvenile cuttlefish *Sepia pharaonis*. *Biology Letters*, *8*(5), 740-743.
- Lemaire, J., & Richard, A. (1978). Organogenesis of the eye of the cephalopod *Sepia officinalis*. *Bulletin de la Societe Zoologique de France*, *103*(3), 373-378.
- Lenhossék, M. (1894). Zur Kenntnis der Netzhaut der Cephalopoden. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, *58*, 636-660.
- Lenhossék, M. (1896). Histologische Untersuchungen am Sehappen der Cephalopoden. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, *47*(1), 45-120.

- Liu, K. L., Chuah, M. I., & Lee, K. K. (1995). Soluble factors from the olfactory bulb attract olfactory Schwann cells. *The Journal of Neuroscience*, 15(2), 990-1000.
- Lythgoe, J. N. (1979). *The Ecology of Vision*. Oxford: Clarendon Press, 256 pp.
- Maddock, L., & Young, J. Z. (1987). Quantitative differences among the brains of cephalopods. *Journal of Zoology*, 212(4), 739-767.
- Makino, A., & Miyazaki, T. (2010). Topographical distribution of visual cell nuclei in the retina in relation to the habitat of five species of Decapodiformes (Cephalopoda). *Journal of Molluscan Studies*, 76(2), 180-185.
- Mangold, K., & Boletzky, S. (1973). New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19(1), 7-12.
- Marquis, F. (1989). Die Embryonalentwicklung des Nervensystems von *Octopus vulgaris* Lam. (Cephalopoda. Octopoda), eine histologische Analyse. *Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft Basel*, 99, 23-76.
- Marthy, H. J. (1973). An experimental study of eye development in the cephalopod *Loligo vulgaris*: determination and regulation during formation of the primary optic vesicle. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 29(2), 347-361.
- Martin, G. R., Wilson, K.-J., Wild, J. M., Parsons, S., Kubke, M. F., & Corfield, J. (2007). Kiwi forego vision in the guidance of their nocturnal activities. *PLoS One*, 2(2), e198.
- Martin, R. (1965). On the structure and embryonic development of the giant fibre system of the squid *Loligo vulgaris*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 67(1), 77-85.
- Martin, R., & Rungger, D. (1966). Zur Struktur und Entwicklung des Riesenfasersystems erster Ordnung von *Sepia officinalis* L. (Cephalopoda). *Cell and Tissue Research*, 74(4), 454-463.
- Martin, R. (1969). The structural organization of the intracerebral giant fiber system of cephalopods. The chiasma of the first order giant axons. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 97(1), 50-68.
- Martin, R., & Miledi, R. (1975). A presynaptic complex in the giant synapse of the squid. *Journal of Neurocytology*, 4(2), 121-129.
- Mähnger, L. M., Barbosa, A., Miner, S., & Hanlon, R. T. (2006). Color blindness and contrast perception in cuttlefish (*Sepia officinalis*) determined by a visual sensorimotor assay. *Vision Research*, 46(11), 1746-1753.
- Matsui, S., Seidou, M., Horiuchi, S., Uchiyama, I., & Kito, Y. (1988). Adaptation of a deep-sea cephalopod to the photic environment. Evidence for three visual pigments. *The Journal of General Physiology*, 92(1), 55-66.
- Meister, G. (1972). Organogenese von *Loligo vulgaris* Lam. (Mollusca, Cephalopoda, Teuthoidea, Myopsida, Loliginidae). *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 59, 247-300.
- Messenger, J. B. (1967a). The peduncle lobe: a viso-motor centre in *Octopus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 167, 225-251.
- Messenger, J. B. (1967b). The effects on locomotion of lesions to the viso-motor system in *Octopus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 167, 252-281.
- Messenger, J. B. (1968). The visual attack of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Animal Behaviour*, 16(2), 342-357.
- Messenger, J. B. (1973). Learning performance and brain structure: a study in development. *Brain Research*, 58(2), 519-523.

- Messenger, J. B., Wilson, A. P., & Hedge, A. (1973). Some evidence for colour-blindness in *Octopus*. *The Journal of Experimental Biology*, 59(1), 77-94.
- Messenger, J. B. (1977). Evidence that *Octopus* is colour blind. *The Journal of Experimental Biology*, 70(1), 49-55.
- Messenger, J. B. (1979). The nervous system of *Loligo*: IV. The peduncle and olfactory lobes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1008), 275-309.
- Messenger, J. B. (1996). Neurotransmitters of cephalopods. *Invertebrate Neuroscience*, 2(2), 95-114.
- Meyer, W. T. (1913). *Tintenfische mit besonderer Berücksichtigung von Sepia und Octopus* (Vol. 6, Monographien einheimischer Tiere). Leipzig: Dr. Werner Klinkhardt, 148 pp.
- Michinomae, M., Masuda, H., Seidou, M., & Kito, Y. (1994). Structural basis for wavelength discrimination in the banked retina of the Firefly Squid *Watasenia scintillans*. *The Journal of Experimental Biology*, 193(1), 1-12.
- Miller, A. M., Ramirez, T., Zuniga, F. I., Ochoa, G. H., Gray, S., Kelly, S. D., et al. (2005). Rho GTPases regulate rhabdom morphology in octopus photoreceptors. *Visual Neuroscience*, 22(03), 295-304.
- Moody, M. F., & Robertson, J. D. (1960). The fine structure of some retinal photoreceptors. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 7, 87-92.
- Moody, M. F., & Parriss, J. R. (1960). Discrimination of polarized light by *Octopus*. *Nature*, 186(4728), 839-840.
- Moody, M. F., & Parriss, J. R. (1961). The discrimination of polarized light by *Octopus*: a behavioural and morphological study. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 44(3), 268-291.
- Moody, M. F. (1962). Evidence for the intraocular discrimination of vertically and horizontally polarized light by *Octopus*. *The Journal of Experimental Biology*, 39(1), 21-30.
- Müller, H. (1853). Bericht über einige im Herbst 1852 angestellte vergleichend-anatomische Untersuchungen: Bau der Cephalopoden. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 4, 337-345.
- Muntz, W. R. A. (1977). Pupillary response of cephalopods. In M. Nixon, & J. B. Messenger (Eds.), *The biology of cephalopods* (pp. 277-285). London: Academic Press.
- Muntz, W. R. A., & Johnson, M. S. (1978). Rhodopsins of oceanic decapods. *Vision Research*, 18(5), 601-602.
- Muntz, W. R. A., & Raj, U. (1984). On the visual system of *Nautilus pompilius*. *The Journal of Experimental Biology*, 109(1), 253-263.
- Muntz, W. R. A., & Wentworth, S. L. (1987). An anatomical study of the retina of *Nautilus pompilius*. *The Biological Bulletin*, 173(2), 387-397.
- Muntz, W. R. A., & Gwyther, J. (1988). Visual acuity in *Octopus pallidus* and *Octopus australis*. *The Journal of Experimental Biology*, 134(1), 119-129.
- Muntz, W. R. A., & Gwyther, J. (1989). Short Communication: The visual acuity of octopuses for gratings of different orientations. *The Journal of Experimental Biology*, 142(1), 461-464.
- Muntz, W. R. A. (1991). Anatomical and behavioural studies on vision in nautilus and octopus. *American Malacological Bulletin*, 9(1), 69-74.

- Muntz, W. R. A. (1999). Visual systems, behaviour and environment in cephalopods. In S. N. Archer, M. B. A. Djamgoz, E. R. Loew, J. C. Partridge, & S. Vallerga (Eds.), *Adaptive Mechanisms in the Ecology of Vision* (pp. 467-483). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Nilsson, D.-E., Warrant, E. J., Johnsen, S., Hanlon, R. T., & Shashar, N. (2012). A unique advantage for giant eyes in giant squid. *Current Biology*, 22(8), 683-688.
- Nixon, M., & Mangold, K. (1996). The early life of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopodidae) in the plankton and at settlement: a change in lifestyle. *Journal of Zoology*, 239(2), 301-327.
- Nixon, M., & Mangold, K. (1998). The early life of *Sepia officinalis*, and the contrast with that of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda). *Journal of Zoology*, 245(4), 407-421.
- Nixon, M., & Young, J. Z. (2003). *The brains and lives of cephalopods*. Oxford: Oxford University Press, 408 pp.
- Norman, M. (2000). *Cephalopods - A World Guide* (1st Edition). Hankenheim, Germany: Conch Books, 320 pp.
- Novicki, A., Budelmann, B. U., & Hanlon, R. T. (1990). Brain pathways of the chromatophore system in the squid *Lolliguncula brevis*. *Brain Research*, 519(1-2), 315-323.
- Owen, R. (1835). Cephalopoda. In R. B. Todd (Ed.), *The cyclopaedia of anatomy and physiology* (Vol. I, pp. 517-562). London: Sherwood, Gilbert, and Piper.
- Packard, A. (1969). Visual acuity and eye growth in *Octopus vulgaris* (Lamarck). *Monitore Zoologico Italiano*, 3, 19-32.
- Packard, A. (1972). Cephalopods and fish: the limits of convergence. *Biological Reviews*, 47(2), 241-307.
- Patterson, J. A., & Silver, S. C. (1983). Afferent and efferent components of *Octopus* retina. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 151(3), 381-387.
- Paulsen, R., Zinkler, D., & Delmelle, M. (1983). Architecture and dynamics of microvillar photoreceptor membranes of a cephalopod. *Experimental Eye Research*, 36(1), 47-56.
- Pfefferkorn, A. (1915). Das Nervensystem der Octopoden. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 114, 425-531.
- Phaneuf, M. W. (1999). Applications of focused ion beam microscopy to materials science specimens. *Micron*, 30(3), 277-288.
- Piscopo, S., Moccia, F., Di Cristo, C., Caputi, L., Di Cosmo, A., & Brown, E. R. (2007). Pre- and postsynaptic excitation and inhibition at octopus optic lobe photoreceptor terminals; implications for the function of the 'presynaptic bags'. *European Journal of Neuroscience*, 26(8), 2196-2203.
- Poirier, R., Chichery, R., & Dickel, L. (2004). Effects of rearing conditions on sand digging efficiency in juvenile cuttlefish. *Behavioural Processes*, 67(2), 273-279.
- Pozzo-Miller, L. D., Moreira, J. E., & Llinas, R. R. (1998). The first-order giant neurons of the giant fiber system in the squid: electrophysiological and ultrastructural observations. *Journal of Neurocytology*, 27(6), 419-429.
- Quast, M. J., Neumeister, H., Ezell, E. L., & Budelmann, B. U. (2001). MR microscopy of cobalt-labeled nerve cells and pathways in an invertebrate brain (*Sepia officinalis*, Cephalopoda). *Magnetic Resonance in Medicine*, 45(4), 575-579.
- Ragnarson, B., Bengtsson, L., & Hægerstrand, A. (1992). Labeling with fluorescent carbocyanine dyes of cultured endothelial and smooth muscle cells by growth in dye-containing medium. *Histochemistry*, 97(4), 329-333.

- Rawitz, B. (1891a). Zur Physiologie der Cephalopodenretina. *Archiv für Anatomie und Physiologie*, 5, 367-372.
- Rawitz, B. (1891b). Über Pigmentverschiebungen im Cephalopodenaug unter dem Einfluss der Dunkelheit. *Zoologischer Anzeiger*, 14, 157-158.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 17, 208-212.
- Richardson, K. C., Jarett, L., & Finke, E. H. (1960). Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology*, 35, 313-323.
- Richter, K. (1913). Das Nervensystem der Oegopsiden. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 106, 289-408.
- Robertson, J. D., Bonaventura, J., Kohm, A., & Hiscat, M. (1996). Nitric oxide is necessary for visual learning in *Octopus vulgaris*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 263(1377), 1739-1743.
- Roper, C. F. E., Sweeney, M. J., & Nauen, C. E. (1984). *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries* (Vol. 3, FAO Fisheries Synopsis). Rome: FAO, 277 pp.
- Rosenthal, J. J., & Bezanilla, F. (2000). Seasonal variation in conduction velocity of action potentials in squid giant axons. *The Biological Bulletin*, 199(2), 135-143.
- Rowell, C. H. F., & Wells, M. J. (1961). Retinal orientation and the discrimination of polarized light by octopuses. *The Journal of Experimental Biology*, 38(4), 827-831.
- Ruthensteiner, B., & Heß, M. (2008). Embedding 3D models of biological specimens in PDF publications. *Microscopy Research and Technique*, 71(11), 778-786.
- Ruthensteiner, B. (2008). Soft Part 3D visualization by serial sectioning and computer reconstruction. *Zoosymposia*, 1, 63-100.
- Saalfeld, S., Fetter, R., Cardona, A., & Tomancak, P. (2012). Elastic volume reconstruction from series of ultra-thin microscopy sections. *Nature Methods*, 9(7), 717-720.
- Saibil, H., & Hewat, E. (1987). Ordered transmembrane and extracellular structure in squid photoreceptor microvilli. *The Journal of Cell Biology*, 105(1), 19-28.
- Saidel, W. M. (1979). Relationship between photoreceptor terminations and centrifugal neurons in the optic lobe of octopus. *Cell and Tissue Research*, 204(3), 463-472.
- Saidel, W. M. (1980). Orthogonal polarization sensitivities of squid photoreceptors: implications for a retinal design. *The Biological Bulletin*, 159(2), 490.
- Saidel, W. M. (1981). Evidence for visual mapping in the peduncle lobe of octopus. *Neuroscience Letters*, 24(1), 7-11.
- Saidel, W. M. (1982). Connections of the octopus optic lobe: an HRP study. *The Journal of Comparative Neurology*, 206(4), 346-358.
- Saidel, W. M., Lettvin, J. Y., & MacNichol, E. F. J. (1983). Processing of polarized light by squid photoreceptors. *Nature*, 304(5926), 534-536.
- Saidel, W. M., Shashar, N., Schmolesky, M. T., & Hanlon, R. T. (2005). Discriminative responses of squid (*Loligo pealeii*) photoreceptors to polarized light. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 142(3), 340-346.
- Salehi, S. A. (1989). High voltage electron microscopic study of orderly microtubule system in *Octopus vulgaris* photoreceptor cells. *Journal of Electron Microscopy*, 38(3), 182-189.
- Sanders, F. K., & Young, J. Z. (1940). Learning and other functions of the higher nervous centres of *Sepia*. *Journal of Neurophysiology*, 3(6), 501-526.
- Schaeffel, F., Murphy, C. J., & Howland, H. C. (1999). Accommodation in the cuttlefish (*Sepia officinalis*). *The Journal of Experimental Biology*, 202(Pt 22), 3127-3134.

- Scharpf, E., Haszprunar, G., & Heß, M. (2008). Coleoid cephalopod retinæ - A comparative morphological approach. In *3rd International Symposium Coleoid Cephalopods through Time, Luxemburg, 2008* (pp. 25-27).
- Schkaff, B. (1914). Zur Kenntnis des Nervensystems der Myopsiden. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, *109*, 591-630.
- Schroeder-Reiter, E., & Wanner, G. (2009). Chromosome centromeres: structural and analytical investigations with high resolution scanning electron microscopy in combination with focused ion beam milling. *Cytogenetic and Genome Research*, *124*(3-4), 239-250.
- Schroeder-Reiter, E., Pérez-Willard, F., Zeile, U., & Wanner, G. (2009). Focused ion beam (FIB) combined with high resolution scanning electron microscopy: A promising tool for 3D analysis of chromosome architecture. *Journal of Structural Biology*, *165*(2), 97-106.
- Schultze, M. (1869). Die Stäbchen in der Retina der Cephalopoden und Heteropoden. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, *5*, 1-24.
- Seidou, M., Sugahara, M., Uchiyama, H., Hiraki, K., Hamanaka, T., Michinomae, M., et al. (1990). On the three visual pigments in the retina of the firefly squid, *Watasenia scintillans*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *166*(6), 769-773.
- Shashar, N., & Cronin, T. W. (1996). Polarization contrast vision in *Octopus*. *The Journal of Experimental Biology*, *199*(Pt 4), 999-1004.
- Shashar, N., Rutledge, P., & Cronin, T. (1996). Polarization vision in cuttlefish in a concealed communication channel? *The Journal of Experimental Biology*, *199*(Pt 9), 2077-2084.
- Shashar, N., Harosi, F. I., Banaszak, A. T., & Hanlon, R. T. (1998a). UV radiation blocking compounds in the eye of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *The Biological Bulletin*, *195*(2), 187-188.
- Shashar, N., Hanlon, R. T., & Petz, A. d. (1998b). Polarization vision helps detect transparent prey. *Nature*, *393*(6682), 222-223.
- Shashar, N., Hagan, R., Boal, J. G., & Hanlon, R. T. (2000). Cuttlefish use polarization sensitivity in predation on silvery fish. *Vision Research*, *40*(1), 71-75.
- Shashar, N., Sabbah, S., & Cronin, T. W. (2004). Transmission of linearly polarized light in seawater: implications for polarization signaling. *The Journal of Experimental Biology*, *207*(Pt 20), 3619-3628.
- Shigeno, S., Tsuchiya, K., & Segawa, S. (2001a). Conserved topological patterns and heterochronies in loliginid cephalopods: comparative developmental morphology of the oval squid *Sepioteuthis lessoniana*. *Invertebrate Reproduction & Development*, *39*(3), 161-174.
- Shigeno, S., Tsuchiya, K., & Segawa, S. (2001b). Embryonic and paralarval development of the central nervous system of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana*. *The Journal of Comparative Neurology*, *437*(4), 449-475.
- Shigeno, S., Kidokoro, H., Tsuchiya, K., Segawa, S., & Yamamoto, M. (2001c). Development of the brain in the oegopsid squid, *Todarodes pacificus*: An atlas up to the hatching stage. *Zoological Science*, *18*(4), 527-541.
- Shigeno, S., Kidokoro, H., Tsuchiya, K., Segawa, S., & Yamamoto, M. (2001d). Development of the brain in the oegopsid squid, *Todarodes pacificus*: An atlas from hatchling to juvenile. *Zoological Science*, *18*(8), 1081-1096.

- Shigeno, S., & Yamamoto, M. (2002). Organization of the nervous system in the pygmy cuttlefish, *Idiosepius paradoxus* Ortmann (Idiosepiidae, Cephalopoda). *Journal of Morphology*, 254(1), 65-80.
- Shigeno, S., & Yamamoto, M. (2005). Embryonic brain development of loliginids: axonal scaffold and neuropil formation related to early life styles. *Phuket Marine Biological Center Research Bulletin*, 66, 155-165.
- Silver, S. C., Patterson, J. A., & Mobbs, P. G. (1983). Biogenic amines in cephalopod retina. *Brain Research*, 273(2), 366-368.
- Sirinupong, P., & Suwanjarat, J. (2009). Histology of brain and eye in the pygmy squid, *Idiosepius pygmaeus*. In *26th MST Annual Conference, Chiangmai, Thailand, 2009* (pp. 59-60).
- Sivak, J. G. (1982). Optical properties of a cephalopod eye (the short finned squid, *Illex illecebrosus*). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 147(3), 323-327.
- Sivak, J. G. (1991). Shape and focal properties of the cephalopod ocular lens. *Canadian Journal of Zoology*, 69(10), 2501-2506.
- Sivak, J. G., West, J. A., & Campbell, M. C. (1994). Growth and optical development of the ocular lens of the squid (*Sepioteuthis lessoniana*). *Vision Research*, 34(17), 2177-2187.
- Sivak, J. G. (2004). Through the lens clearly: phylogeny and development: The Proctor Lecture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(3), 740-747.
- Snider, W. D., Zhang, L., Yusoof, S., Gorukanti, N., & Tsering, C. (1992). Interactions between dorsal root axons and their target motor neurons in developing mammalian spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 12(9), 3494-3508.
- Sömmerring, D. W. (1818). *De oculorum hominis animaliumque sectione horizontali commentatio*. Göttingen: Vandenhoeck und Ruprecht, 78 pp.
- Sroczyński, S., & Muntz, W. R. A. (1985). Image structure in *Eledone cirrhosa*, an octopus. *Zoologische Jahrbücher: Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*, 89, 157-168.
- Stanier, J. P., & Young, J. Z. (1955). The optic chiasma of cephalopods and the significance of crossed tracts. *Proceedings of the Anatomical Society of Great Britain and Ireland*, 571.
- Studnitz, G. (1933). Über die chemische Reaktion der Selachier- und Cephalopodenretina. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 19(4), 615-618.
- Suzuki, T., Inada, H., & Takahashi, H. (1985). Retinal adaptation of Japanese common squid (*Todarodes pacificus* Steenstrup) to light changes. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 36(4), 191-199.
- Sweeney, A. M., Haddock, S. H., & Johnsen, S. (2007). Comparative visual acuity of coleoid cephalopods. *Integrative and Comparative Biology*, 47(6), 808-814.
- Talbot, C. M., & Marshall, J. (2010a). Polarization sensitivity in two species of cuttlefish - *Sepia plangon* (Gray 1849) and *Sepia mestus* (Gray 1849) - demonstrated with polarized optomotor stimuli. *The Journal of Experimental Biology*, 213(Pt 19), 3364-3370.
- Talbot, C. M., & Marshall, J. (2010b). Polarization sensitivity and retinal topography of the striped pyjama squid (*Sepioloidea lineolata* - Quoy/Gaimard 1832). *The Journal of Experimental Biology*, 213(Pt 19), 3371-3377.

- Talbot, C. M., & Marshall, J. N. (2011). The retinal topography of three species of coleoid cephalopod: significance for perception of polarized light. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1565), 724-733.
- Tansey, E. M. (1980). Aminergic fluorescence in the cephalopod brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 291(1046), 127-145.
- Tasaki, K., & Karita, K. (1966a). Discrimination of horizontal and vertical planes of polarized light by the cephalopod retina. *Japanese Journal of Physiology*, 16(2), 205-216.
- Tasaki, K., & Karita, K. (1966b). Intraretinal discrimination of horizontal and vertical planes of polarized light by octopus. *Nature*, 209(5026), 934-935.
- Thanos, S., & Mey, J. (1995). Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats. *The Journal of Neuroscience*, 15(2), 1057-1079.
- Thevenaz, P., Ruttimann, U. E., & Unser, M. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Transactions on Image Processing*, 7(1), 27-41.
- Tompsett, D. H. (1939). *Sepia* (L.M.B.C. memoirs on typical British marine plants and animals, Vol. 32): University Press, 184 pp.
- Tonosaki, A. (1965). The fine structure of the retinal plexus in *Octopus vulgaris*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 67(4), 521-532.
- Torres, S. C., Camacho, J. L., Matsumoto, B., Kuramoto, R. T., & Robles, L. J. (1997). Light/dark-induced changes in rhabdom structure in the retina of *Octopus bimaculoides*. *Cell and Tissue Research*, 290(1), 167-174.
- Villanueva, R., Nozais, C., & Boletzky, S. v. (1995). The planktonic life of octopuses. *Nature*, 377(6545), 107-107.
- Villanueva, R., Nozais, C., & Boletzky, S. v. (1996). Swimming behaviour and food searching in planktonic *Octopus vulgaris* Cuvier from hatching to settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208(1-2), 169-184.
- Villinger, C., Gregorius, H., Kranz, C., Höhn, K., Münzberg, C., Wichert, G., et al. (2012). FIB/SEM tomography with TEM-like resolution for 3D imaging of high-pressure frozen cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 138(4), 549-556.
- Wainwright, S. A. (1988). Form and function in organisms. *American Zoologist*, 28, 671-680.
- Warrant, E. J. (1999). Seeing better at night: life style, eye design and the optimum strategy of spatial and temporal summation. *Vision Research*, 39(9), 1611-1630.
- Warrant, E. J., & Locket, N. A. (2004). Vision in the deep sea. *Biological Reviews*, 79(3), 671-712.
- Watanuki, N., Kawamura, G., Kaneuchi, S., & Iwashita, T. (2000). Role of vision in behavior, visual field, and visual acuity of cuttlefish *Sepia esculenta*. *Fisheries Science*, 66, 417-423.
- Weeks, F. I., & Duncan, G. (1974). Photoreception by a cephalopod retina: response dynamics. *Experimental Eye Research*, 19(5), 493-509.
- Wells, M. J. (1958). Factors affecting reactions to *Mysis* by newly hatched *Sepia*. *Behaviour*, 13(1-2), 96-111.
- Wells, M. J., & Wells, J. (1959). Hormonal control of sexual maturity in *Octopus*. *The Journal of Experimental Biology*, 36(1), 1-33.
- Wells, M. J. (1961). Centres for tactile and visual learning in the brain of *Octopus*. *The Journal of Experimental Biology*, 38(4), 811-826.
- Wells, M. J., & Young, J. Z. (1965). Split-brain preparations and touch learning in the octopus. *The Journal of Experimental Biology*, 43(3), 565-579.

- Wells, M. J., & Young, J. Z. (1969). The effect of splitting part of the brain or removal of the median inferior frontal lobe on touch learning in octopus. *The Journal of Experimental Biology*, 50(2), 515-526.
- Wells, M. J., & Young, J. Z. (1972). The median inferior frontal lobe and touch learning in the octopus. *The Journal of Experimental Biology*, 56(2), 381-402.
- Wentworth, S. L., & Muntz, W. R. A. (1992). Development of the eye and optic lobe of *Octopus*. *Journal of Zoology*, 227(4), 673-684.
- West, J. A., Sivak, J. G., & Doughty, M. J. (1995). Microscopical evaluation of the crystalline lens of the squid (*Loligo opalescens*) during embryonic development. *Experimental Eye Research*, 60(1), 19-35.
- Wild, E., Wollesen, T., Haszprunar, G., & Heß, M. (2013). Comparative 3D-microanatomy and histology of the eyes and central nervous systems in coleoid cephalopod hatchlings. *in preparation*.
- Willekens, B., Vrensen, G., Jacob, T., & Duncan, G. (1984). The ultrastructure of the lens of the cephalopod *Sepiolo*: a scanning electron microscopic study. *Tissue & Cell*, 16(6), 941-950.
- Williams, L. W. (1910). *The anatomy of the common squid Loligo pealii*, Lesueur. Leiden, Holland: E. J. Brill, 92 pp.
- Williamson, R., Ichikawa, M., & Matsumoto, G. (1993). Neuronal circuits in cephalopod vision. *Netherlands Journal of Zoology*, 44(3-4), 272-283.
- Williamson, R., & Chrachri, A. (2004). Cephalopod neural networks. *Neurosignals*, 13(1-2), 87-98.
- Wirth, R. (2004). Focused Ion Beam (FIB): A novel technology for advanced application of micro- and nanoanalysis in geosciences and applied mineralogy. *European Journal of Mineralogy*, 16(6), 863-876.
- Wirz, K. (1954). Études quantitatives sur le système nerveux des céphalopodes. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, 238(12), 1353-1355.
- Wirz, K. (1959). Étude biométrique du système nerveux des céphalopodes. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, 93, 78-117.
- Wolken, J. J. (1958). Retinal structure: mollusc cephalopods: *Octopus*, *Sepia*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 4(6), 835-838.
- Wollesen, T., Loesel, R., & Wanninger, A. (2008). FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*. *Acta Biologica Hungarica*, 59, 111-116.
- Wollesen, T., Loesel, R., & Wanninger, A. (2009). Pygmy squids and giant brains: Mapping the complex cephalopod CNS by phalloidin staining of vibratome sections and whole-mount preparations. *Journal of Neuroscience Methods*, 179(1), 63-67.
- Wollesen, T., Degnan, B. M., & Wanninger, A. (2010a). Expression of serotonin (5-HT) during CNS development of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*. *Cell and Tissue Research*, 342(2), 161-178.
- Wollesen, T., Cummins, S. F., Degnan, B. M., & Wanninger, A. (2010b). FMRFamide gene and peptide expression during central nervous system development of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*. *Evolution & Development*, 12(2), 113-130.
- Wollesen, T., Nishiguchi, M. K., Seixas, P., Degnan, B. M., & Wanninger, A. (2012a). The VD1/RPD2 alpha 1-neuropeptide is highly expressed in the brain of cephalopod mollusks. *Cell and Tissue Research*, 348(3), 439-452.

- Wollesen, T., Sukhsangchan, C., Seixas, P., Nabhitabhata, J., & Wanninger, A. (2012b). Analysis of neurotransmitter distribution in brain development of benthic and pelagic octopod cephalopods. *Journal of Morphology*, 273(7), 776-790.
- Yamamoto, M., & Takasu, N. (1984). Membrane particles and gap junctions in the retinas of two species of cephalopods, *Octopus ocellatus* and *Sepiella japonica*. *Cell and Tissue Research*, 237(2), 209-218.
- Yamamoto, M. (1985). Ontogeny of the visual system in the cuttlefish, *Sepiella japonica*. I. Morphological differentiation of the visual cell. *The Journal of Comparative Neurology*, 232(3), 347-361.
- Yamamoto, M., Takasu, N., & Uragami, I. (1985). Ontogeny of the visual system in the cuttlefish, *Sepiella japonica*. II. Intramembrane particles, histofluorescence, and electrical responses in the developing retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 232(3), 362-371.
- Yamamoto, M., Shimazaki, Y., & Shigeno, S. (2003). Atlas of the embryonic brain in the pygmy squid, *Idiosepius paradoxus*. *Zoological Science*, 20(2), 163-179.
- Yamamoto, T., Tasaki, K., Sugawara, Y., & Tonosaki, A. (1965). Fine structure of the *Octopus* retina. *The Journal of Cell Biology*, 25, 345-359.
- Yamazaki, A., Yoshida, M., & Uematsu, K. (2002). Post-hatching development of the brain in *Octopus ocellatus*. *Zoological Science*, 19(7), 763-771.
- Young, J. Z. (1938). The functioning of the giant nerve fibres of the squid. *The Journal of Experimental Biology*, 15(2), 170-185.
- Young, J. Z. (1939). Fused neurons and synaptic contacts in the giant nerve fibres of cephalopods. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 229(564), 465-503.
- Young, J. Z. (1960a). Regularities in the retina and optic lobes of *Octopus* in relation to form discrimination. *Nature*, 186, 836-839.
- Young, J. Z. (1960b). The statocysts of *Octopus vulgaris*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 152, 3-29.
- Young, J. Z. (1962a). The retina of cephalopods and its degeneration after optic nerve section. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 245(718), 1-18.
- Young, J. Z. (1962b). The optic lobes of *Octopus vulgaris*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 245(718), 19-58.
- Young, J. Z. (1963). Light- and dark-adaptation in the eyes of some cephalopods. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 140(2), 255-272.
- Young, J. Z. (1965a). The nervous pathways for poisoning, eating and learning in *Octopus*. *The Journal of Experimental Biology*, 43(3), 581-593.
- Young, J. Z. (1965b). The central nervous system of *Nautilus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 249(754), 1-25.
- Young, J. Z. (1965c). The buccal nervous system of *Octopus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 249(755), 27-44.
- Young, J. Z. (1965d). The centres for touch discrimination in *Octopus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 249(755), 45-67.
- Young, J. Z. (1965e). The diameters of the fibres of the peripheral nerves of *Octopus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 162, 47-79.
- Young, J. Z. (1965f). The organization of a memory system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 163(992), 285-320.

- Young, J. Z. (1967). The visceral nerves of *Octopus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 253(782), 1-22.
- Young, J. Z. (1970). Neurovenous tissues in cephalopods. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 257(815), 309-321.
- Young, J. Z. (1971). *The anatomy of the nervous system of Octopus vulgaris*. Oxford: Clarendon Press, 690 pp.
- Young, J. Z. (1972). The organization of a cephalopod ganglion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 263(854), 409-429.
- Young, J. Z. (1973a). The giant fibre synapse of *Loligo*. *Brain Research*, 57(2), 457-460.
- Young, J. Z. (1973b). Receptive fields of the visual system of the squid. *Nature*, 241(5390), 469-471.
- Young, J. Z. (1974). The central nervous system of *Loligo*. I. The optic lobe. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(885), 263-302.
- Young, J. Z. (1976a). The 'cerebellum' and the control of eye movements in cephalopods. *Nature*, 264(5586), 572-574.
- Young, J. Z. (1976b). The nervous system of *Loligo*. II. Suboesophageal centres. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(930), 101-167.
- Young, J. Z. (1977). The nervous system of *Loligo*. III. Higher motor centres: the basal supraoesophageal lobes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(948), 351-398.
- Young, J. Z. (1978). Short-lasting memory in lower nervous centers in *Octopus*. *Journal of Neurobiology*, 9(2), 159-172.
- Young, J. Z. (1979). The nervous system of *Loligo*. V. The vertical lobe complex. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1009), 311-354.
- Young, J. Z. (1983). The distributed tactile memory system of *Octopus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 218(1211), 135-176.
- Young, R. E., Roper, C. F. E., & Walters, J. F. (1979). Eyes and extraocular photoreceptors in midwater cephalopods and fishes: Their roles in detecting downwelling light for counterillumination. *Marine Biology*, 51(4), 371-380.
- Young, R. E., Vecchione, M., & Mangold, K. M. (2012). Cephalopoda Cuvier 1797. Octopods, squids, nautilus, etc.. Version 04 July 2012 (under construction). <http://tolweb.org/Cephalopoda/19386/2012.07.04>.
- Young, R. J., Dingle, T., Robinson, K., & Pugh, P. J. A. (1993). An application of scanned focused ion beam milling to studies on the internal morphology of small arthropods. *Journal of Microscopy*, 172(1), 81-88.
- Young, R. J., & Moore, M. V. (2005). Dual-Beam (FIB-SEM) Systems. In L. A. Giannuzzi, & F. A. Stevie (Eds.), *Introduction to Focused Ion Beams* (pp. 247-268). New York: Springer.
- Zampighi, G., Maturana, H., & Frenk, S. (1970). Fine structure of the cephalopod retina. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*, 7(1-2-3), R48.
- Zill, S. N., Frazier, S. F., Macfarland, D. L., & Fish, S. E. (1993). Characterization of insect sense organs and optical clearing of whole-mount preparations using dil in fixed tissues. *The Journal of Experimental Biology*, 175(1), 299-303.
- Zonana, H. V. (1961). Fine structure of the squid retina. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, 109, 185-205.

## 6. ANHANG

### 6.1 Chronologische Tabelle zur Augen und Hirnforschung an Cephalopoden

Tabelle 14: Chronologische Tabelle zur Augen- und Hirnforschung an Cephalopoden.

Autor(en)	Jahr	wesentliche Inhalte
Sömmering	1818	Darstellung und Beschreibung des Auges von <i>Sepia officinalis</i> anhand von Horizontalschnitten
Blainville	1822	Vergleichende anatomische Beschreibung der Augen an den Beispielen <i>Sepia</i> und <i>Octopus</i>
Owen	1835	Anatomische Beschreibung der Augen verschiedener Cephalopodenarten
Müller	1853	Histologische Untersuchung der Retina mit Einteilung in Schichten: Hyaloidea, Stäbchen, Pigment, Körnerschicht, horizontale Ausläufer des Sehnerv
Babuchin	1864	Vergleichende histologische Untersuchungen der Retina: erste Erwähnung der Basalmembran
Hensen	1865	Histologische Untersuchung aller Augenstrukturen mit Schwerpunkt Retina und ihren Schichten
Cheron	1866	Anatomie des Nervensystems mehrerer Cephalopodenarten
Clarke	1867	Histologische Untersuchung der Struktur der optischen Loben von <i>Sepia</i>
Schultze	1869	Untersuchung der Stäbchen: Zusammensetzung aus „Plättchen“
Dietl	1878	Untersuchungen zur Organisation des Gehirns der Cephalopoden, Benennung der verschiedenen Gehirnloben
Grenacher	1883	Untersuchung der Retina“schichten“ anhand von Mikrotomschnitten, Einführung des Begriffes „Rhabdom“ in der Beschreibung der Cephalopodenretina
Grobben	1886	Schematische Zeichnungen des Zentralnervensystems von <i>Eledone moschata</i> und <i>Nautilus pompilius</i>
Rawitz	1891	Untersuchungen zur Physiologie der Cephalopodenretina
Rawitz	1891	Untersuchungen zu Pigmentverschiebungen bei Dunkelheit
Lenhossek	1894	Untersuchungen zur Retina der Cephalopoden
Lenhossek	1896	Histologische Untersuchungen am optischen Lobus der Cephalopoden
Beer	1897	Akkommodation des Cephalopodenauges
Kopsch	1899	Untersuchungen des optischen Lobus, erste Erwähnung der Überkreuzung der optischen Nerven vor ihrem Eintritt in den optische Lobus
Hesse	1900	Untersuchungen zur Retina der Cephalopoden: heller Streifen ohne Pigment in der Mitte des Auges, gleichmäßige Verteilung der Stäbchen in der Netzhaut
Chun	1903	Untersuchungen der Leuchtorgane und Augen von Tiefseecephalopoden: mehrere Regionen mit verlängerten Rhabdomen in der Mitte der Augen
Hamlyn-Harris	1903	Histologische Untersuchung der Statocysten verschiedener Cephalopodenarten aus dem Mittelmeer
Hess	1905	Physiologische und mikroskopische Untersuchungen zur Anatomie des Cephalopodenauges: Netzhautfarbe, Pigmentwanderung, horizontaler Streifen mit mehr Photorezeptorzellen

Williams	1910	Beschreibung der Anatomie des Nervensystems und der Sinnesorgane von <i>Loligo pealii</i>
Hillig	1912	Anatomische Beschreibung des Nervensystems von <i>Sepia officinalis</i>
Meyer	1913	Übersicht über das Nervensystem und die Sinnesorgane von <i>Octopus</i> und <i>Sepia</i>
Richter	1913	Anatomische Untersuchung des Nervensystems dreier Arten der Oegopsida aus dem Mittelmeer: <i>Illex illecebrosus</i> , <i>Ommatostrephes sagittatus</i> und <i>Stenoteuthis bartrami</i>
Schkaff	1914	Beschreibung der Anatomie des Nervensystems der Myopsiden an den Beispielen <i>Loligo marmorae</i> und <i>Sepietta minor</i>
Glockauer	1915	Vergleichend-anatomische und histologische Untersuchungen des Cephalopodenauges
Pfefferkorn	1915	Beschreibung der Anatomie des Nervensystems der Octopoden an den Beispielen <i>Eledone moschata</i> und <i>Octopus vulgaris</i>
Heidermanns	1928	Untersuchungen über das Formensehen und die Orientierung der Cephalopoden im Raum
Klein	1931	Histologische Untersuchungen der Nervenendigungen in den Statocysten von <i>Sepia officinalis</i>
Studnitz	1933	Chemische Untersuchungen an der Netzhaut von <i>Sepia officinalis</i>
Young	1938	Elektrophysiologische Untersuchungen zur Funktionsweise der Riesen-nervenfasern bei <i>Loligo pealii</i>
Tompsett	1939	Morphologische Beschreibung des Nervensystems und der Sinnesorgane von <i>Sepia officinalis</i>
Young	1939	Histologische Untersuchung der synaptischen Kontakte in den Riesenfasern bei <i>Loligo pealii</i> , <i>Loligo forbesi</i> , <i>Loligo vulgaris</i> und <i>Sepia officinalis</i> anhand von Serienschritten durch das Nervensystem
Wirz	1954	Morphometrische Untersuchungen des Nervensystems an 13 Arten der Cephalopoden
Boycott & Young	1955	Histologische Untersuchung des Vertikallobus als Teil des Gedächtnis-systems in Kombination mit Verhaltensversuchen
Stanier & Young	1955	Untersuchung des optischen Chiasmas
Boycott & Young	1957	Untersuchungen zur visuelle Unterscheidungsfähigkeit bei <i>Octopus vulgaris</i> durch Entfernen des Vertikallobus
Wolken	1958	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Retinastruktur und der Photorezeptoren bei <i>Octopus vulgaris</i> und <i>Sepia officinalis</i>
Amoore et al.	1959	Chemische Untersuchung der Endo- und Perilymphe der Statocysten und Augen bei <i>Octopus vulgaris</i>
Wirz	1959	Morphometrie des Nervensystem von 34 Arten der Cephalopoden
Moody & Robertson	1960	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Feinstruktur der Photo-rezeptoren von <i>Octopus</i>
Young	1960	Histologische Untersuchung der Retina und des optischen Lobus zur Formerkennung bei <i>Octopus</i>
Young	1960	Histologische Untersuchung der Statocysten von <i>Octopus vulgaris</i>
Boycott	1961	Histologische und elektrophysiologische Untersuchungen zur funktionelle Organisation des Gehirns von <i>Sepia officinalis</i>
Moody & Parriss	1961	Morphologische und Verhaltensuntersuchungen zur Erkennung von polarisierten Licht an <i>Octopus vulgaris</i>
Wells	1961	Untersuchungen zum taktilen und visuellen Lernen bei <i>Octopus</i> mittels Hirnläsionen

Zonana	1961	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur der Retina bei <i>Loligo</i>
Moody	1962	Verhaltensversuche zur Wahrnehmung des vertikal und horizontal polarisierten Lichts bei <i>Octopus vulgaris</i>
Young	1962	Histologische Untersuchung der Retina von <i>Octopus vulgaris</i> : Einführung des Begriffes „supporting cells“ (Stützzellen), Feststellung von regionalen Unterschieden
Young	1962	Histologische Untersuchung der optischen Loben von <i>Octopus vulgaris</i>
Dilly et al.	1963	Elektronenmikroskopische Untersuchung der optischen Nerven und der optischen Loben bei <i>Eledone</i> , <i>Octopus</i>
Jander et al.	1963	Verhaltensversuche zur Wahrnehmung von polarisiertem Licht bei <i>Euprymna morsei</i> und <i>Sepioteuthis lessoniana</i>
Young	1963	Beschreibung der Pigmentwanderung bei Hell-/Dunkeladaptation, Vermessung der Rhabdomlängen an Horizontal- und Transversalschnitten durch die Mitte der Augen
Gray & Young	1964	Elektronenmikroskopische Beschreibung der Synapsen im Gehirn von <i>Octopus</i>
Martin	1965	Histologische Untersuchung der Struktur und Embryonalentwicklung des RiesennervenfaserSystems bei <i>Loligo vulgaris</i> anhand von Serienschnitten
Tonosaki	1965	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Feinstruktur des retinalen Plexus bei <i>Octopus vulgaris</i>
Wells & Young	1965	Verhaltensversuche zum Lernverhalten bei <i>Octopus vulgaris</i> mittels Hirnläsionen
Yamamoto et al.	1965	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur der Retina von <i>Octopus vulgaris</i>
Young	1965	Ermittlung der für Giftausstoß, Fressen und Lernen zuständigen Gehirnregionen mittels Hirnläsionen und Verhaltensexperimenten bei <i>Octopus</i>
Young	1965	Histologische Untersuchung und Rekonstruktion des zentralen Nervensystems von <i>Nautilus pompilius</i> und <i>Nautilus macromphalus</i> anhand von Serienschnitten
Young	1965	Histologische und elektrophysiologische Untersuchung des buccalen Nervensystems bei <i>Octopus vulgaris</i>
Young	1965	Untersuchung des unteren Frontalsystems mittels Serienschnitten in unterschiedlichen Schnittebenen und der Verhaltensänderungen beim Tastsinn nach Entfernung einzelner Teile des unteren Frontalsystems bei <i>Octopus</i>
Young	1965	Vermessung des Durchmessers einzelner Nervenfasern und Klassifizierung der peripheren Nerven bei <i>Octopus vulgaris</i>
Martin & Rungger	1966	Histologische Beschreibung der Struktur und der Embryonalentwicklung des RiesennervenfaserSystems bei <i>Sepia officinalis</i>
Tasaki & Karita	1966	Elektrophysiologische Untersuchung zur Wahrnehmung der horizontalen und vertikalen Ebenen des polarisierten Lichts bei <i>Octopus vulgaris</i>
Arnold	1967	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der Linsen an Embryos von <i>Loligo pealii</i> und <i>Octopus vulgaris</i>
Hara & Hara	1967	Untersuchung der Eigenschaften von Rhodospin und Retinochrom aus der Retina von <i>Ommastrephes sloani pacificus</i>
Hara et al.	1967	Untersuchung der Absorptionsspektren von Rhodospin und Retinochrom aus der Retina von <i>Octopus vulgaris</i>

Messenger	1967	Histologische Untersuchung, Rekonstruktion anhand von Serienschritten und Einordnung als viso-motorisches Zentrum mittels Hirnläsionen des Pedunkellobus bei <i>Octopus vulgaris</i>
Messenger	1967	Verhaltensexperimente an <i>Octopus vulgaris</i> mit Hirnläsionen in verschiedenen Bereichen des viso-motorischen Systems
Young	1967	Histologische Untersuchung der Innervation der Organe über Visceralnerven an <i>Octopus vulgaris</i> mittels Serienschritten
Denton & Warren	1968	Morphologische Untersuchung der unterschiedlich großen Augen der Histioteuthidae
Florey & Winesdorfer	1968	Chemische und elektronenmikroskopische Untersuchung der cholinergen Nervendigungen im Gehirn von <i>Octopus dofleini</i>
Martin	1969	Histologische Untersuchungen zur Organisation des intracerebralen Riesenfasersystems, mit Schwerpunkt auf das Chiasma der Axone der Riesenfasererster Ordnung bei <i>Loligo vulgaris</i> , <i>Sepia officinalis</i> und <i>Illex coindetii</i>
Packard	1969	Verhaltensversuche und histologische Untersuchungen zu Sehschärfe und Augenwachstum bei <i>Octopus vulgaris</i>
Wells & Young	1969	Verhaltensversuche zur Lernfähigkeit bei Hirnläsionen an <i>Octopus</i>
Collewijn	1970	Verhaltensversuche zu okulomotorischen Bewegungen an <i>Sepia officinalis</i>
Gray	1970	Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Synapsen in der Retina von <i>Octopus vulgaris</i>
Zampighi et al.	1970	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Retina von <i>Dosidicus gigas</i> und <i>Octopus vulgaris</i>
Frösch	1971	Quantitative Untersuchungen am Zentralnervensystem der Schlüpfstadien von zehn mediterranen Cephalopodenarten mittels Punktzählmethode
Gervasio et al.	1971	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Feinstruktur der synaptischen Kontakte im Riesennervenfaserensystem bei <i>Loligo vulgaris</i>
Giuditta et al.	1971	Zellkernzählungen an homogenisiertem Gewebe von unterschiedlichen Gehirnbereichen von <i>Octopus vulgaris</i>
Young	1971	Ausführliche Beschreibung der Anatomie des Zentralnervensystems von <i>Octopus vulgaris</i>
Case et al.	1972	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur und der synaptischen Beziehungen in den optischen Loben von <i>Eledone</i> und <i>Octopus</i>
Wells & Young	1972	Verhaltensversuche zum Lernvermögen von <i>Octopus vulgaris</i> nach Entfernung oder Verletzung des mittleren unteren Frontallobus
Young	1972	Histologische Untersuchung und Vergleich der Stellarganglien von <i>Octopus vulgaris</i> , <i>Sepia officinalis</i> und <i>Loligo vulgaris</i> , <i>L. forbesi</i> und <i>L. pealeii</i>
Cohen	1973	Ultrastrukturelle Untersuchung der Photorezeptoren und deren synaptischen Beziehungen an <i>Loligo pealeii</i>
Duncan & Croghan	1973	Elektrophysiologische Untersuchungen an der isolierten Retina von <i>Sepiolo atlantica</i>
Duncan & Weeks	1973	Elektrophysiologische Untersuchungen zur <i>in vitro</i> Photorezeption einer Retina bei <i>Sepiolo atlantica</i>
Frösch	1973	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur der Iris von <i>Octopus vulgaris</i>

Hobbs & Young	1973	Vergleich des Pedunkellobus der Cephalopoden mit dem Cerebellum der Vertebraten anhand von histologischen Schnitten
Marthy	1973	Beschreibung der Augenentwicklung bei <i>Loligo vulgaris</i> anhand von Gewebeentnahmen und Transplantationen
Messenger	1973	Verhaltensversuche zur postembryonalen Entwicklung des Lernverhaltens und der Gehirnstruktur bei <i>Sepia officinalis</i>
Messenger et al.	1973	Verhaltensversuche zur Farbenblindheit von <i>Octopus vulgaris</i>
Young	1973	Histologische Untersuchung der Synapsen im Riesennervenfaser-system bei <i>Loligo pealeii</i>
Young	1973	Histologische Untersuchung der rezeptiven Felder im Sehsystem von <i>Loligo</i>
Abrahamson et al.	1974	Vergleich der Eigenschaften der Photorezeptoren von Vertebraten und Invertebraten am Beispiel <i>Loligo</i>
Chichery & Chichery	1974	Histochemische Untersuchung des zentralen Nervensystems von <i>Sepia officinalis</i>
Daw & Pearlman	1974	Elektrophysiologische und histologische Untersuchungen zur Pigmentmigration und der Adaptation bei <i>Loligo pealei</i>
Frösch	1974	Histologische Untersuchungen am Subpendukulaten Lobus von <i>Octopus</i>
Giuditta & Pozzo	1974	Statistische Untersuchungen zum postembryonalen Wachstum des optischen Lobus von <i>Octopus vulgaris</i>
Lam et al.	1974	Untersuchungen zur Neurotransmittersynthese in der Retina von <i>Octopus joubini</i> , <i>Octopus vulgaris</i> , <i>Lolliguneula brevis</i> und <i>Loligo pealei</i>
Weeks & Duncan	1974	Elektrophysiologische Untersuchungen zur Photorezeption bei <i>Sepiolo atlantica</i>
Young	1974	Histologische Untersuchung der optischen Loben bei <i>Loligo vulgaris</i> , <i>Loligo pealeii</i> , <i>Loligo forbesi</i> und <i>Alloteuthis subulata</i>
Clark	1975	Untersuchung des Elektroretinogramms bei <i>Sepiolo atlantica</i>
Martin & Miledi	1975	Elektronenmikroskopische Untersuchung des präsynaptischer Komplexes in den Axonen der Riesennervenfaser bei <i>Loligo vulgaris</i>
Hara & Hara	1976	Untersuchungen zur Verteilung von Rhodopsin und Retinochrom in der Retina von <i>Loligo pealei</i>
Young	1976	Untersuchung des Pedunkelobus und seiner Rolle bei der Kontrolle der Augenbewegung bei Cephalopoden: Vergleich mit dem Cerebellum der Vertebraten
Young	1976	Histologische Untersuchung der suboesophagealen Loben bei <i>Loligo vulgaris</i> , <i>L. pealeii</i> , <i>L. forbesi</i> und <i>Alloteuthis subulata</i>
Messenger	1977	Hinweise auf die Farbenblindheit von <i>Octopus vulgaris</i> anhand von Verhaltensversuchen
Muntz	1977	Untersuchung der Pupillenform und Struktur der Retina
Young	1977	Histologische Untersuchung der basalen supraoesophagealen Loben bei <i>Loligo vulgaris</i> , <i>Loligo pealeii</i> , <i>Loligo forbesi</i> und <i>Alloteuthis subulata</i>
Aldred et al.	1978	Beschreibung des blinden Octopus <i>Cirrothauma murrayi</i>
Anderson et al.	1978	Untersuchungen zur Chemie der Photorezeptormembran der Retina von <i>Loligo(Doryteuthis) plei</i> und <i>Loligo pealei</i>
Lemaire & Richard	1978	Untersuchung der Organogenese des Auges von <i>Sepia officinalis</i>
Muntz & Johnson	1978	Spektrale Untersuchung des Rhodopsins an fünf Arten der Decapoda: <i>Ommastrephes caroli</i> , <i>Mastigoteuthis hjorti</i> , <i>Pyroteuthis margaritifera</i> , <i>Histioteuthis meleagroteuthis</i> , <i>Sepiolo atlantica</i>
Young	1978	Untersuchungen zum Kurzzeitgedächtnis von <i>Octopus</i> mittels Hirnläsionen

Messenger	1979	Histologische Untersuchung der Pedunkel- und olfaktorische Loben von <i>Loligo</i>
Saidel	1979	Histologische Untersuchungen zu den Photorezeptorendigungen im optischen Lobus von <i>Octopus bimacolooides</i> und <i>Octopus bimaculatus</i> mittels Cobalt-Färbung
Young	1979	Histologische Untersuchung des Vertikalissystems bei <i>Loligo vulgaris</i> , <i>L. pealeii</i> , <i>L. forbesi</i> und <i>Alloteuthis subulata</i>
Young et al.	1979	Verhaltensversuche zur Wahrnehmung von absinkendem Licht an <i>Abraliopsis</i> spp., <i>Abralia trigonura</i> , <i>Enoploteuthis</i> sp. und <i>Pyroteuthis addolux</i>
Tansey	1980	Histologische und histochemische Untersuchungen der Gehirne coleoider Cephalopoden
Saidel	1981	Immunhistochemische Untersuchungen zur Abbildung der visuellen Informationen im Pedunkellobus von <i>Octopus bimacolooides</i> und <i>O. bimaculatus</i>
Saidel	1982	Immunhistochemische Untersuchungen der Verbindungen der optischen Loben bei <i>Octopus bimacolooides</i> und <i>O. bimaculatus</i>
Sivak	1982	Untersuchung der optischen Eigenschaften des Cephalopodenauges bei <i>Illex illecebrosus</i>
Patterson & Silver	1983	Elektrophysiologische und histologische Untersuchungen zu den afferenten und efferenten Komponenten der Retina von <i>Octopus vulgaris</i>
Paulsen et al.	1983	Molekulare Untersuchungen zur Architektur der Photorezeptormembran von <i>Eledone aldrovandii</i>
Saidel et al.	1983	Elektrophysiologische Untersuchungen zur Verarbeitung polarisierten Lichts bei <i>Loligo pealei</i>
Silver et al.	1983	Untersuchung der biogenen Amine in der Retina von <i>Octopus vulgaris</i> , <i>Sepia officinalis</i> und <i>Alloteuthis forbesii</i>
Young	1983	Verhaltensversuche zur Verteilung des taktilen Gedächtnisses bei <i>Octopus vulgaris</i>
Haghighat et al.	1984	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Feinstruktur der Synapsen im optischen Lobus von <i>Loligo pealii</i>
Muntz & Raj	1984	Anatomische und histologische Untersuchungen sowie Verhaltensversuche zum Sehsystem von <i>Nautilus pompilius</i>
Willekens et al.	1984	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Ultrastruktur der Linse bei <i>Sepiella atlantica</i>
Yamamoto & Takasu	1984	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Membranen in der Retina von <i>Octopus ocellatus</i> und <i>Sepiella japonica</i>
Budelmann & Young	1985	Verfolgung der Nervenbahnen der Armnerven und der Mantelnerven bei <i>Octopus vulgaris</i>
Corde & Shinitzky	1985	Untersuchung der Membranzusammensetzung der distalen Segmente der Retina an <i>Loligo</i> sp. und <i>Sepia officinalis</i>
Sroczynski & Muntz	1985	Untersuchung zu den Abbildungseigenschaften der Linse bei <i>Eledone cirrhosa</i>
Suzuki et al.	1985	Histologische Untersuchungen nach unterschiedlichen Beleuchtungsversuchen zur Adaptation an Lichtveränderungen bei <i>Todarodes pacificus</i>
Yamamoto	1985	Elektronenmikroskopische Untersuchung der morphologische Differenzierung der Sehzellen bei <i>Sepiella japonica</i>

Yamamoto et al.	1985	Histochemische und elektrophysiologische Untersuchungen der Retina während der Embryonalentwicklung bei <i>Sepiella japonica</i>
Budelmann & Young	1987	Untersuchung der Brachialnerven von <i>Sepia officinalis</i> und <i>Loligo vulgaris</i> anhand von Cobalt-Färbungen
Maddock & Young	1987	Morphometrische Untersuchung der Gehirne von adulten Cephalopoden anhand von histologischen Schnitten
Muntz & Wentworth	1987	Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Retina von <i>Nautilus pompilius</i>
Saibil & Hewat	1987	Röntgengraphische und histologische Untersuchung der Struktur der Photorezeptormikrovilli bei <i>Alloteuthis subulata</i>
Matsui et al.	1988	Chromatographische und histologische Untersuchung der Retina von <i>Watasenia scintillans</i> zur Adaptation an die photische Umwelt: Beweis für drei Sehpigmente
Muntz & Gwyther	1988	Verhaltensversuche zur Sehschärfe bei <i>Octopus pallidus</i> und <i>O. australis</i>
Marquis	1989	Histologische Untersuchungen zur Embryonalentwicklung des Nervensystems von <i>Octopus vulgaris</i>
Muntz & Gwyther	1989	Verhaltensversuche zur Sehschärfe bei Gittern mit unterschiedlichen Orientierungen an <i>Octopus paalidus</i>
Salehi	1989	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Photorezeptorzellen bei <i>Octopus vulgaris</i>
Novicki et al.	1990	Histologische Untersuchung der Nervenbahnen im Chromatophorensystem von <i>Lolliguncula brevia</i> mittels Cobalt-Färbung
Seidou et al.	1990	Chromatographische Untersuchungen zu den drei Sehpigmenten in der Retina von <i>Watasenia scintillans</i>
Bleckmann et al.	1991	Ableitungen der durch Wasserbewegungen hervorgerufenen Potentiale im Gehirn von <i>Sepia officinalis</i>
Bullock & Budelmann	1991	Physiologische Untersuchungen und Ableitungen am Gehirn von <i>Sepia officinalis</i>
Gilly et al.	1991	Verhaltensversuche und elektrophysiologische Experimente zur Entwicklung der Riesennervenfasern und zur Kontrolle des Fluchtverhaltens an <i>Loligo opalescens</i>
Muntz	1991	Anatomische Untersuchungen und Verhaltensstudien zum Sehen an <i>Nautilus</i> und <i>Octopus</i>
Sivak	1991	Untersuchungen zur Form und den fokalen Eigenschaften der Linse der Cephalopoden
Wentworth & Muntz	1992	Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung zur Entwicklung des Auges und des optischen Lobus an Embryos von <i>Octopus australis</i> und <i>O. pallidus</i>
Aguilar et al.	1993	Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Retina von <i>Octopus bimaculoides</i> zur Lokalisation der Retinaproteine in sich entwickelnden Photorezeptoren
Budelmann & Young	1993	Histologische Untersuchung und Cobalt-Färbung der Augenmuskeln, Augenmuskelnerven und der okulomotorischen Neurone im Zentralnervensystem von Decabrachia
Gleadall et al.	1993	Histologische und elektrophysiologische Untersuchungen zur Kontrolle der Pigmentwanderung in der Retina von <i>Octopus fangsio</i>
Williamson et al.	1993	Beschreibung der neuronale Netzwerke im Sehsystem der Cephalopoden

Michinomae et al.	1994	Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur strukturellen Basis der Wellenlängenunterscheidung in der Retina von <i>Watasenia scintillans</i>
Sivak et al.	1994	Histologische und physikalische Untersuchungen zum Wachstum und zur Entwicklung der Linse bei <i>Sepioteuthis lessoniana</i>
West et al.	1995	Histologische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Linse von <i>Loligo opalescens</i> während der Embryonalentwicklung
Messenger	1996	Zusammenfassung der bei Cephalopoden vorkommenden Neurotransmitter
Robertson et al.	1996	Verhaltensversuche zum visuellen Lernen bei <i>Octopus vulgaris</i> bei Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase
Shashar & Cronin	1996	Verhaltensversuche zur Wahrnehmung des Polarisationskontrasts bei <i>Octopus vulgaris</i> und <i>O. briareus</i>
Shashar et al.	1996	Verhaltensexperimente und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Retina von <i>Sepia officinalis</i> zum Polarisationskontrastsehen als verborgener Kommunikationskanal
Dickel et al.	1997	Verhaltensversuche und histologische Untersuchungen zur postembryonalen Reifung des Vertikalissystems und zur frühen Entwicklung des Jagdverhaltens bei Schlüpflingen <i>Sepia officinalis</i>
Torres et al.	1997	Histologische und elektronen- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zu hell-/dunkel-induzierte Veränderungen in der Rhabdomstruktur in der Retina von <i>Octopus bimaculoides</i>
Pozzo-Miller et al.	1998	Elektrophysiologische und ultrastrukturelle Untersuchungen zum Riesenervenfaserensystem von <i>Loligo pealei</i>
Shashar et al.	1998	Verhaltenstests zum Beutefang mithilfe von polarisiertem Licht an Adulten und Schlüpflingen von <i>Loligo pealei</i>
Shashar et al.	1998	Chromato- und spektrographische Untersuchung der Corneae und Linsen von <i>Sepia officinalis</i>
De Velasco et al.	1999	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der hell- und dunkeladaptierten Retinae von <i>Octopus bimaculoides</i>
Jagger & Sands	1999	Anatomische und physikalische Untersuchung der optischen eigenschaften der Linsen von <i>Octopus australis</i> und <i>O. pallidus</i>
Muntz	1999	Beschreibung der Sehsystem und der optischen Eigenschaften der Augen der Cephalopoda
Schaeffel et al.	1999	Untersuchung der Akkommodation bei <i>Sepia officinalis</i> mittels Infrarotretinoskopie und histologische Untersuchung der Augen und ihrer Muskeln
Rosenthal & Bezanilla	2000	Elektrophysiologische Untersuchung der Leitungsgeschwindigkeiten der Riesenervenfaseraxone in Hinblick auf saisonale Variationen bei <i>Loligo pealei</i>
Shashar et al.	2000	Verhaltensversuche zur Rolle des Polarisationskontrastsehens auf den beutefang bei <i>Sepia officinalis</i>
Watanuki et al.	2000	Verhaltensversuche und histologische Untersuchungen der Retina zum visuellen Feld bei <i>Sepia esculenta</i>
Quast et al.	2001	Untersuchung der Nervenzellen und der Nervenbahnen im Gehirn von <i>Sepia officinalis</i> mittels Cobalt-Färbung und Magnetresonanztomographie
Shigeno et al.	2001	Histologische Untersuchung der embryonalen und postembryonalen Entwicklung des Gehirns von <i>Todarodes pacificus</i>

Shigeno et al.	2001	Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Embryonalentwicklung des Nervensystems von <i>Sepioteuthis lessoniana</i>
Byrne et al.	2002	Verhaltensversuche zum Augengebrauch bei <i>Octopus vulgaris</i> : Präferenz eines Auges
Han & Chang	2002	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Feinstruktur der Retina und der optischen Loben bei <i>Octopus minor</i> und <i>Todarodes pacificus</i>
Shigeno & Yamamoto	2002	Histologische und immunhistochemische Untersuchung des Nervensystem von <i>Idiosepius paradoxus</i>
Yamazaki et al.	2002	Histologische und volumetrische Untersuchungen zur postembryonalen Entwicklung des Gehirns bei <i>Octopus ocellatus</i>
Chrachri & Williamson	2003	Immunhistochemische und elektrophysiologische Untersuchung der postsynaptischen Ströme im optischen Lobus von <i>Sepia officinalis</i>
Nixon & Young	2003	Ausführliche beschreibung der Gehirne der verschiedenen Cephalopodengruppen
Yamamoto et al.	2003	Histologischer Atlas des Gehirns von <i>Idiosepius paradoxus</i> während der Embryonalentwicklung
Byrne et al.	2004	Verhaltensversuche zum lateral asymmetrischer Gebrauch der Augen bei <i>Octopus vulgaris</i>
Kröger & Gislén	2004	Vermessung der optischen Eigenschaften der Augen und der chromatischen Aberration im Auge von <i>Watasenia scintillans</i>
Williamson & Chrachri	2004	Beschreibung der neuronale Netzwerke von Cephalopoden
Douglas et al.	2005	Untersuchungen zur Pupillenreaktion bei <i>Sepia officinalis</i> und <i>Eledone cirrhosa</i>
Groeger et al.	2005	Verhaltensexperimente zur Sehschärfe und ihrer Veränderung während der Ontogenie bei <i>Sepia officinalis</i>
Miller et al.	2005	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Rhabdommorphologie in den Photorezeptoren von <i>Octopus bimaculoides</i> während der Hell-/Dunkeladaptation
Saidel et al.	2005	Elektrophysiologische Untersuchungen der Reaktionen der Photorezeptoren auf polarisiertes Licht bei <i>Loligo pealeii</i>
Shigeno & Yamamoto	2005	Histologische und immunhistochemische Untersuchung der Embryonalentwicklung des Gehirns bei <i>Loliolus japonica</i> , <i>Sepioteuthis lessoniana</i> und <i>Loligo edulis</i>
Groeger et al.	2006	Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Retina während dem Wachstum mittels Elektroretinogrammen
Mähnger et al.	2006	Verhaltenstests zur Farbenblindheit und der Kontrastwahrnehmung bei <i>Sepia officinalis</i>
Grimaldi et al.	2007	Abschätzung der Gehirngröße von <i>Octopus vulgaris</i> mittels Ultraschall
Piscopo et al.	2007	Physiologische und immunocytochemische Untersuchungen zu den Photorezeptorterminalien im optischen Lobus von <i>Octopus vulgaris</i>
Sweeney et al.	2007	Vergleichende Untersuchung der Sehschärfe bei coleoiden Cephalopoden
Amano et al.	2008	Immunhistochemische Untersuchung des Gehirns von <i>Loligo bleakeri</i>
Darmaillacq et al.	2008	Verhaltensversuche zum embryonalen visuellen Lernen bei <i>Sepia officinalis</i>
Darmaillacq & Shashar	2008	Verhaltensversuche zur Wahrnehmung des Polarisationskontrasts und histologische Untersuchungen der Retina bei <i>Sepia elongata</i>
D'Este et al.	2008	Immunhistochemische Untersuchung der optischen Loben von <i>Octopus vulgaris</i> : erster Nachweis der Cholinacetyltransferase

Scharpf et al.	2008	Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Retinae und Kartierung der Photorezeptorlängen und –dichten bei <i>Eledone cirrhosa</i> , <i>Octopus vulgaris</i> , <i>Sepia officinalis</i> und <i>Sepietta neglecta</i>
Wollesen et al.	2008	Immunhistochemische Untersuchungen am Gehirn von <i>Idiosepius notoides</i>
Bozzano et al.	2009	Histologische Untersuchung zur Augenentwicklung bei <i>Sepioteuthis australis</i> und Berechnung der optischen Auflösung und Sehschärfe
Sirinupong & Suwanjarat	2009	Histologische Untersuchung des Gehirns und der Augen von <i>Idiosepius pygmaeus</i>
Wollesen et al.	2009	Kartierung des Gehirns durch Phalloidin-färbung bei <i>Idiosepius notoides</i>
Allen et al.	2010	Verhaltensversuche zur Nachtsicht und Tarnung bei <i>Sepia apama</i>
Hao et al.	2010	Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Entwicklung der Retina bei <i>Sepia esculenta</i>
Makino & Miyazaki	2010	Histologische Untersuchung der Retina zur Verteilung der Kerne der Sehzellen in Bezug zum Habitat bei fünf Decabrachia-Arten: <i>Euprymna morsei</i> , <i>Sepioteuthis lessoniana</i> , <i>Todarodes pacificus</i> , <i>Eucleoteuthis luminosa</i> und <i>Thysanoteuthis rhombus</i>
Talbot & Marshall	2010	Nachweis der Polarisationsempfindlichkeit bei <i>Sepia plangon</i> und <i>S. mestus</i> mittels Verhaltenstests
Talbot & Marshall	2010	Verhaltensversuche zur Polarisationsempfindlichkeit und Untersuchung der Topographie der Retina bei <i>Sepioloidea lineolata</i>
Wollesen et al.	2010	Immuncytochemische Untersuchung des zentralen Nervensystems während der Embryonalentwicklung von <i>Idiosepius notoides</i> : FMRFamid-Gen- und Peptidexpression
Wollesen et al.	2010	Immunhistochemischen Untersuchungen am Gehirn von <i>Idiosepius notoides</i> während der Entwicklung: Expression von Serotonin
Guibé & Dickel	2011	Verhaltensversuche zur Unterschlupfwahl bei Schlüpflingen von <i>Sepia officinalis</i> nach embryonaler visueller Erfahrung
Talbot & Marshall	2011	Untersuchung der Topographie der Retina als Hinweis auf Wahrnehmung polarisierten Lichts bei <i>Sepia plangon</i> , <i>Sepioteuthis lessoniana</i> und <i>Octopus cyanea</i>
Lee et al.	2012	Verhaltensversuche zu den Effekten früher visueller Erfahrung auf die Hintergrundwahl bei juvenilen <i>Sepia pharaonis</i>
Nilsson et al.	2012	Ausführungen zur Theorie, dass die großen Augen der Riesentintenfische ( <i>Architeuthis</i> und <i>Mesonychoteuthis</i> ) der Entdeckung großer Räuber dienen
Wollesen et al.	2012	Immuncytochemische Untersuchung der Gehirne von <i>Idiosepius notoides</i> , <i>Euprymna scolopes</i> , <i>Sepioteuthis australis</i> , <i>Loligo vulgaris</i> und <i>Octopus vulgaris</i>
Wollesen et al.	2012	Immunhistochemische Untersuchung der Gehirne von <i>Octopus vulgaris</i> und <i>Argonauta hians</i> während der Embryonalentwicklung zur Verteilung der Neurotransmitter
Cartron et al.	2013	Verhaltensversuche zur Reifung der Polarisations- und der Leuchtdichteempfindlichkeit bei Schlüpflingen von <i>Sepia officinalis</i>
Wild et al.	2013	Vergleichende 3D-Mikroanatomie und Histologie sowie Morphometrie der Augen und des ZNS von sechs coleoiden Cephalopoden: <i>Sepia officinalis</i> , <i>Rossia macrosoma</i> , <i>Sepietta obscura</i> , <i>Idiosepius notoides</i> , <i>Loligo vulgaris</i> und <i>Octopus vulgaris</i>

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Verwendete Tiere und Karten zur Herkunft. ....	19
<b>Abbildung 2:</b> Übersicht über die Emissionsspektren aller verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe .....	28
<b>Abbildung 3:</b> FIB-FESEM. ....	30
<b>Abbildung 4:</b> Vergleich der verschiedenen Ansätze zur elastischen Registrierung. ....	34
<b>Abbildung 5:</b> Mittsagittaler Schnitt durch das zentrale Nervensystem eines coleoiden Cephalopoden mit den Hauptneuropilen ( <i>Loligo vulgaris</i> ). ....	37
<b>Abbildung 6:</b> <i>Sepia officinalis</i> Schlüpfling: Histologie der Kopfregion (Transversalschnitte; Richardsonfärbung). ....	44
<b>Abbildung 7:</b> <i>Rossia macrosoma</i> Schlüpfling: Histologie der Kopfregion (Transversalschnitte; Trichrome de Masson Färbung, außer F: Azanfärbung). ....	46
<b>Abbildung 8:</b> <i>Sepietta obscura</i> Schlüpfling: Histologie der Kopfregion (Transversalschnitte; B, C, E, H: Azanfärbung; D, F, G: Trichrome de Masson Färbung). ....	48
<b>Abbildung 9:</b> <i>Idiosepius notoides</i> Schlüpfling: Histologie der Kopfregion (Transversalschnitte; Richardsonfärbung). ....	50
<b>Abbildung 10:</b> <i>Loligo vulgaris</i> Schlüpfling: Histologie der Kopfregion (Transversalschnitte; Richardsonfärbung). ....	52
<b>Abbildung 11:</b> <i>Octopus vulgaris</i> Schlüpfling: Histologie der Kopfregion (Transversalschnitte; Azanfärbung). ....	54
<b>Abbildung 12:</b> 3D-Rekonstruktion der Augen und des Zentralnervensystems: sub- und supraoesophageale Masse, optische Loben und Armnerven (vergleichende dorsale An- sichten, A-F gleicher Maßstab). ....	56
<b>Abbildung 13:</b> Vergleichende Augenhistologie (Transversalschnitte durch die Mitte der Linsen mit Oberflächenmodellen der linken Retinae – nicht maßstabsgetreu; die graue Pfeilspitze zeigt nach rostral). ....	58
<b>Abbildung 14:</b> Vergleichende Retinahistologie (ventraler Bereich, Transversalschnitte durch die Mitte der Linsen). ....	61
<b>Abbildung 15:</b> Vergleichende Histologie der optischen Loben mit den plexiformen Schichten (Transversalschnitte). ....	62
<b>Abbildung 16:</b> Vergleichende Histologie des Zentralnervensystems I (Transversalschnitte auf Höhe der optischen Kommissur). ....	65
<b>Abbildung 17:</b> Suboesophageale Neuropile. 3D-Rekonstruktion des Zentralnervensystems (vergleichende links laterale und frontale Ansichten; A-F verschiedene Maßstäbe). ....	66
<b>Abbildung 18:</b> Supraoesophageale Neuropile. 3D-Rekonstruktion des Zentralnervensystems (vergleichende links laterale und frontale Ansichten; A-F verschiedene Maßstäbe). ....	69
<b>Abbildung 19:</b> Vergleichende Histologie des Zentralnervensystems II (Transversalschnitte auf Höhe der Brachiopedalkonnektive). ....	71
<b>Abbildung 20:</b> 3D-Rekonstruktion der anterioren suboesophagealen Masse (vergleichende Ventralansichten). ....	73
<b>Abbildung 21:</b> Semidünnschnittserie 1 durch das Auge und die Retina profunda eines Schlüpfings von <i>Sepia officinalis</i> sowie 3D-Rekonstruktion der optischen Nerven. ....	80
<b>Abbildung 22:</b> Semidünnschnittserie 2 durch das Auge und die Retina profunda eines Schlüpfings von <i>Sepia officinalis</i> sowie 3D-Rekonstruktion der optischen Nerven. ....	82
<b>Abbildung 23:</b> Fluoreszenzstereomikroskopie mit einem Neurotracingfarbstoff (Dil). ....	84
<b>Abbildung 24:</b> Fluoreszenzstereomikroskopie mit mehreren Neurotracingfarbstoffen. ....	86

<b>Abbildung 25:</b> Konfokalmikroskopie der mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten Horizontalschnitte durch den Kopf eines Schlüpfings von <i>Sepia officinalis</i> (siehe Tabelle 4, Nr. 04). ....	91
<b>Abbildung 26:</b> Histologie des Sehsystems und Feinstruktur der Retina profunda des optischen Lobus (TEM) von <i>Sepia officinalis</i> . .....	92
<b>Abbildung 27:</b> 3D-Rekonstruktion der Retina profunda von <i>Sepia officinalis</i> (ssTEM). ....	94
<b>Abbildung 28:</b> FIB-FESEM gestützte Strukturdatenerfassung aus der äußeren plexiformen Schicht von <i>Sepia officinalis</i> und kleine Auswahl der daraus entstandenen Bilderserie. ....	96
<b>Abbildung 29:</b> FIB-FESEM gestützte 3D-Rekonstruktion der Photorezeptorterminalen von <i>Sepia officinalis</i> . .....	98
<b>Abbildung 30:</b> Graphische Visualisierung der relativen Volumenwerte (Tabelle 12) .....	111
<b>Abbildung 31:</b> Vergleichende Volumetrie: relative Neuropilvolumina (diese Untersuchung, Tabelle 12) vs. Lobenvolumina (Frösch 1971: Tabelle 5) .....	113
<b>Abbildung 32:</b> Das optische Chiasma der Cephalopoden in der Literatur. ....	123

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Lebensweise der untersuchten Arten. ....	15
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über die untersuchte Arten und die verwendeten Methoden. ....	20
<b>Tabelle 3:</b> IUPAC-Namen und Exzitations-/ Emissionswerte der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. ....	21
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht über die Vibratomschnitte und das Auflegemuster der Carbocyaninkristalle auf der Retina von <i>Sepia officinalis</i> . ....	22
<b>Tabelle 5:</b> Schnittserien von der Kopfreion von Cephalopoden-Schlüpflingen. ....	25
<b>Tabelle 6:</b> Semidünnschnittserien durch Auge und optischen Lobus von <i>Sepia officinalis</i> . ....	25
<b>Tabelle 7:</b> Filter des Fluoreszenzstereomikroskops und verwendete Farbstoffe. ....	27
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht der im Konfokalmikroskop befindlichen Laser. ....	28
<b>Tabelle 9:</b> Vergleich der Ultradünnschnittserie vom TEM und der FIB-Serie durch den optischen Lobus zur 3D-Rekonstruktion von <i>Sepia officinalis</i> . ....	30
<b>Tabelle 10:</b> Die Loben des Cephalopoden-ZNS und ihre Funktionen (nach Young 1971; Budelmann et al. 1997; Nixon und Young 2003) .....	43
<b>Tabelle 11:</b> Volumetrische Daten der Augen und des ZNS (absolute Werte). ....	76
<b>Tabelle 12:</b> Volumetrische Daten des ZNS (relative Werte) .....	77
<b>Tabelle 13:</b> Visualisierung und Morphometrie des ZNS der untersuchten Cephalopoden in der Literatur. ....	103
<b>Tabelle 14:</b> Chronologische Tabelle zur Augen- und Hirnforschung an Cephalopoden. ....	151

**DANK**

---

Mein größter Dank gilt **PD Dr. Martin Heß**, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Doktorarbeit unter seiner Betreuung zu schreiben. Er war dabei immer mit Rat und Tat zur Stelle und hatte für alle Probleme ein offenes Ohr.

Außerdem möchte ich **Prof. Dr. Gerhard Haszprunar** dafür danken, dass er die nötige Infrastruktur für dieses Forschungsprojekt gestellt und auch immer wieder neue Ideen miteingebracht hat. Besonders in Erinnerung bleiben werden zudem die gemeinsamen Besuche des Dachauer Volksfests und die Essenseinladungen, bei denen wir die hervorragenden Kochkünste seiner Ehefrau genießen durften.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich **Heidemarie Gensler**, die mich in die Techniken des Schneidens und der Elektronenmikroskopie eingeführt hat. Außerdem schafft sie es auf ihre unvergleichliche Art immer wieder, den Blick für andere Perspektiven zu öffnen!

Einige Personen und Institutionen haben zudem maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen und verdienen großen Dank:

**Dr. Sigurd von Boletzky** für die Schnittserien von *Rossia macrosoma* und *Sepietta obscura*, **Prof. Dr. Andreas Wanninger** und **Tim Wollesen** für die Beschaffung von *Idiosepius notoides*, **Prof. Dr. Gerhard Wanner** für die Datenakquise am FIB-FESEM und das **Elitenetzwerk Bayern** für die finanzielle Unterstützung mittels Stipendium und Sachmittel.

Auch bei den übrigen Mitgliedern der **AG Heß/Haszprunar**, v.a. **Petra Koch**, **Andreas Hawe**, **Max Scheungrab** und **Katja Schulze**, möchte ich mich für die nette Atmosphäre und die gemeinsamen Aktivitäten auch außerhalb des Unialltags, wie Video und Grillabende, kleine Sammelfahrten und einfach geselliges Beisammensein, bedanken.

Zuletzt möchte ich meinem Mann **Helmut** danken, dass er mich die ganzen Jahre hinweg unterstützt hat und mir den Rücken freigehalten hat, wenn es nötig war!

## **EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG**

---

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 22.08.2013

.....

Elvira Wild