

## Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhypphen

MANFRED GIRBARDT

Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena  
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

Mit 12 Abbildungen

Eingegangen am 24. Februar 1969

### Zusammenfassung

Alle Apikalregionen vegetativer Hyphen von 24 untersuchten Pilzarten unterschiedlicher systematischer Zugehörigkeit besitzen einen Spitzenkörper, der kalottenförmig oder sphäroid sein kann. Ultrastrukturell repräsentiert der Spitzenkörper ein Grundplasmaareal unterschiedlicher Größe und Form, das Apexvesikel, Mikrovesikel und Ribosomen enthält. Die Membran der Vesikel besitzt eine unkontrastierte Mittelschicht, die von gleicher Dicke (41,5 Å) ist wie die des Plasmalemmas und sich signifikant von der des ER (28,1 Å) unterscheidet.

Echte Golgi-Dictyosomen fehlen. Morphologisch charakterisierte Einzelcisternen, die in unterschiedlicher Dichte im gesamten Hyphenplasma auftreten, scheinen die sekretorische Funktion des Golgi-Apparates zu übernehmen. Sie bilden peripher die Apexvesikel, in denen wahrscheinlich Exoenzyme apikalwärts transportiert und am Apex ausgeschleust werden.

Bei Sistierung des Wachstums wird die Akkumulation der vesikulären Komponenten des Spitzenkörpers aufgehoben. Die Einzelvesikel erfahren dabei keine strukturelle Veränderung. Bei Krümmungen erfolgt eine Translokation des gesamten Vesikelaggregates.

Es wird ein Modell vorgelegt, dessen Grundlage die Rekonstruktion einer Schnittserie ist, in dem jedoch Details, die das Ergebnis der Gesamtuntersuchungen sind, korrigiert wurden.

### Summary

#### Ultrastructure of the Apical Region of Fungal Hyphae

All apical regions of vegetative hyphae of 24 fungal species of different systematical origin are possessing an apical body the appearance of which may be caplike or spheroidal. Ultrastructurally the apical body represents an area of ground cytoplasm of different size and shape, containing apical vesicles, microvesicles and ribosomes. The vesicles-membrane has an uncontrasted middle-layer of the same thickness (41,5 Å) as the plasmalemma and is significantly different from that of the ER (28,1 Å).

True Golgi-dictyosomes are lacking. Morphologically characterized single cisternae, appearing in graded density in the whole hyphal cytoplasm seem to take over secretory function of the Golgi-apparatus. They produce Apex vesicles peripherally in which probably are transported exoenzymes apically and are extruded at the apex.

Accumulation of the vesicular components of the apical body is destroyed as stopping of growth is induced. No structural changes of single vesicles occur. Translocation of the whole vesicles-aggregation takes place if the apex is bent.

A model is constructed, based on reconstruction of serial sections and corrected due to results of the whole investigations.

## 1. Einleitung

Die Apikalregion von Pilzhypphen ist ein Zellort, der spezifische Eigenaktivitäten besitzt und an dem sich Aktivitäten der gesamten Zelle auswirken können. Er verdient daher besondere Aufmerksamkeit.

Meist wird nur ein extrem kleiner, konischer Bereich passiv vorwärtsgeschoben („Spitzenwachstum“). Das Vorwärtsschieben ist fast augenblicklich sistiert, wenn Noxen auf die Zelle einwirken (GIRBARDT 1957). Die lichtoptisch faßbare Reaktion im Apex liegt zeitlich *vor* anderen Veränderungen der Zelle, die sich als Stauung des Grundplasmas, Mitochondrienfragmentation und Abrundung der Kerne äußern können.

Krümmungen als Folge von Reizen (Licht: JAFFE *et al.* 1962; Griseofulvin: BRIAN 1949; Deckglasauflage: GIRBARDT 1957) oder als natürlicher Prozeß (z. B. Haken- und Schnallenbildung), entstehen meist nur in der Apikalregion und werden verursacht durch unterschiedliches Wachstum der beiden Zellwandflanken. Die äußere Gestalt des Apex ist vom osmotischen Potential des umgebenden Mediums (ROBERTSON *et al.* 1968) oder anderen Umweltbedingungen abhängig. Dabei können Sonderformen (LIESE *et al.* 1964) auftreten.

Wahrscheinlich ist der Hyphenapex auch der einzige Ort, an dem Hyphenfusionen realisierbar sind (LANGE 1966) und der sich damit durch besondere Enzymaktivität auszeichnet. Diese Eigenschaft ist vor allem bedeutsam für die meist auf die Ausscheidung von Exoenzymen angewiesene Pilzzelle.

Lichtoptisch zeigen die Hyphenspitzen von 35 untersuchten Basidiomycetenarten bis auf eine fragliche Ausnahme einen phasenoptisch und färberisch darstellbaren, etwa 1—2  $\mu\text{m}$  großen sphärischen „Spitzenkörper“ (GIRBARDT 1957), der auch in einigen Ascomyceten vorhanden ist (GIRBARDT 1955). Elektronenoptisch sind in den Spitzen von *Polystictus versicolor* vesikuläre Elemente vorhanden (GIRBARDT 1965), die auch bei Ascomyceten (BRENNER *et al.* 1968), Phycomyceten (PEAT *et al.* 1967, GROVE *et al.* 1967, 1968, MARCHANT *et al.* 1967) und Hefen (MOOR 1967) nachgewiesen sind.

Auch nichtpilzliche Objekte mit Spitzenwachstum (*Streptomyces*: BRADLEY *et al.* 1968; *Acetabularia*: WERZ 1965; Chara-Rhizoide: SIEVERS 1967; Wurzelhaare: SIEVERS 1963, 1965; Pollenschläuche: LARSON 1965) zeigen elektronenoptisch ähnliche Strukturen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß den an der Spitze wachsenden Zelltypen ein gleicher oder ähnlicher ultrastruktureller Bauplan eigen ist. Dieser Frage sollte an Apices von Hyphen unterschiedlicher systematischer Zugehörigkeit nachgegangen werden.

## 2. Material und Methode

### 2.1. Kultivierung

Als Nährsubstrat dient Malz-Pepton-Agar (4% Malzextrakt, 0,5% Pepton, 2% Agar), die Bebrütung erfolgt bei + 24° C.

### 2.2. Lebendbeobachtung

Die Gelatinenährböden der Objektträgerkulturen (GIRBARDT 1956) sind den Brechungsindices der Grundplasmen der einzelnen Arten angeglichen. Die Gelatinekonzentrationen variieren zwischen 12 und 22%, die Nährstoffzusätze sind die gleichen wie unter 2.1. beschrieben.

### 2.3. Fixierung

Osmium- (Os), Permanganat- (Pg) und Glutaraldehydfixierung (GA) werden variiert. Besonderheiten siehe unter „Ergebnisse“. Als Grundfixierung dienen:

a) 4 Stdn. Kellenberger-Fixierung (RYTER *et al.* 1958) bei Zimmertemperatur,  
½ Std. Waschen mit Pufferlösung pH 7,2,

2 Stdn. Behandlung mit Lysozymlösung (1 mg/ml Puffer),

10 min Waschen mit Pufferlösung pH 5,9,

4 Stdn. Behandlung mit Uranylazetatlösung (pH 5,9),

3 Stdn. Entwässern über Acetonstufen (30, 50, 70, 90, 100%),

Einbetten in Vestopal.

b) 10 min 2%  $\text{KMnO}_4$  (gelöst in Leitungswasser) bei Zimmertemperatur,

10 min Waschen in Leitungswasser,

30 min Behandlung mit Uranylazetat (gelöst in Aqua dest.),

10 min Waschen in Aqua dest.,

Entwässerung und Einbettung wie unter I.

c) 30 min 5% Glutaraldehyd (gelöst in 0,005 mol Phosphatpuffer, pH 7,0) bei Zimmertemperatur,

1 Std. Waschen in 0,005 mol Phosphatpuffer,

2 Stdn. Nachfixierung mit 1%  $\text{OsO}_4$ , gelöst in obigem Puffer,

5 min Waschen mit Aqua dest.,

2 Stdn. 0,5% Uranylacetat (gelöst in Aqua dest.),

Entwässerung und Einbettung wie unter a).

Teilweise Schnittkontrastierung nach REYNOLDS (1963). Die Bestimmung der Osmolalität der Fixierungslösungen erfolgte mit der gleichen Apparatur, die für Molekulargewichtsbestimmungen beschrieben ist (HESSE 1967).

### 2.4. Zielpräparation

Die auf einem Agarfilm gewachsene Deckglaskultur wird ohne vorherige Lebendbeobachtung (die Auflage des zweiten Deckglases führt zu vorübergehendem Wachstumsstillstand) durch Aufbringen mehrerer Tropfen Fixierungslösung bei Zimmertemperatur fixiert und die für die Ultramikrotomie (Ultratome I und Porter-Blum-Ultramikrotom) vorgesehene Hyphenspitze in der auspolymerisierten Flacheinbettung lichtmikroskopisch ausgewählt und zielpräpariert (GIRBARDT 1965 a). Für Querschnittserien erfolgt das Zuspitzen des ausgesägten Blöckchenareals von etwa 10 nm Länge und 5 nm Breite von Hand. Das zugespitzte Blöckchenareal wird ohne Verwendung eines Blöckchensupports direkt in das Ultramikrotom eingespannt.

### 2.5. Elektronenmikroskopie

An Geräten standen zur Verfügung: SEM 3 und KEM 1 des VEB Werk für Fernseh-elektronik (Aufnahmen bei 50 und 60 kV, 4000- bis 20 000fach) und Siemens Elmiskop I

(Objektraumkühlung, Aufnahme bei 80 kV, 40 000- bis 80 000fach). Eichung der Vergrößerung mit Gitterabdruckfolien (Intervallabstand  $0,77 \mu\text{m}$ ) in halbjährigem Turnus. Für die Auswertung erfolgte entsprechende Korrektur der Meßwerte.

## 2.6. Auswertung

Jeder Längsschnitt, der nicht genau parallel der Längsachse verläuft, zeigt eine Hyphe, die mit elliptischer Begrenzung endet und so die eigentliche Spitze vortäuschen kann. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, werden nur solche Serien verwendet, bei denen im Einzelschnitt der Hyphendurchmesser über etwa  $50 \mu$  Hyphenlänge annähernd konstant bleibt (vgl. Abb. 2). Damit ist gewährleistet, daß die Medianschnitte die äußerste Hyphenspitze getroffen haben müssen.

Insgesamt wurden 127 Hyphenspitzen in Schnittserien zerlegt, davon fünf in Quer-, die übrigen in Längsschnitte. 53 Serien wurden mehr oder weniger vollständig erfaßt, von den übrigen nur Einzelschnitte photographisch registriert.

Die Messung der Membrandicken erfolgte an Elektronenmikrogrammen, die elektronenoptisch bei 80 000facher Vergrößerung erfaßt und photographisch auf 240 000fach nachvergrößert waren. Für die Messung wurde ein Fadenzähler (Strichabstand  $0,1 \text{ mm}$ ) verwendet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Typen der Apikalregionen bei verschiedenen Pilzarten

Über die untersuchten Arten, die verwendeten Methoden und die Ergebnisse gibt Tabelle 1 Auskunft. Alle Apikalregionen zeigen lebend im Scheitel eine phasenoptisch faßbare Substanz, deren Brechungsindex  $n_D > 1,5$  ist und die entweder die Form einer unscharf begrenzten Kalotte (Abb. 1 *a* und *b*, *SpK*) oder eines schärfer konturierten Sphäroids (Abb. 1 *c—f*, *SpK*) besitzt.

Der Kalottentyp („Typ I“) ist bis auf eine fragliche Ausnahme (*Chaetocladium*) allen Phycomyceten gemein. Sämtliche Asco- (Abb. 1 *c—e*) und Basidiomyceten (GIRBARDT 1957) zeigen die sphäroide Form („Typ II“), die auch bei den bisher untersuchten Fungi imperfecti zu finden ist (Abb. 1 *f*) und dem als Spitzenkörper bezeichneten Gebilde entspricht. Elektronenoptisch besteht der Spitzenkörper aus einer Ansammlung unterschiedlich geformter Vesikel (Abb. 1 *g*).

Bei den Phycomyceten (Abb. 2 *a*) sind die Vesikel (*ApV*) in einem längeren Bereich der Apikalregion konzentriert, ihre Zahl nimmt erst in dem die Zellkerne mitführenden Cytoplasma merklich ab. Der kontinuierliche Übergang von der Vesikelhäufung im Scheitel und der etwas loseren Anordnung im angrenzenden Hyphenbereich erklärt die diffuse Abgrenzung („Typ I“) des Spitzenkörpers im Lebendbild.

Asco- (Abb. 2 *b*) und Basidiomyceten (Abb. 2 *c*) zeigen eine scharfe Trennung zwischen den akkumulierten Vesikeln im Scheitel und dem rückwärtigen Hyphenbereich („Typ II“). Dabei ist es gleichgültig, ob die Zellkerne (ZK) bis in Apexnähe vordringen (Abb. 2 *b*) oder einen größeren Abstand vom Scheitel beibehalten, wie dies bei den meisten Basidiomyceten der Fall ist (Abb. 2 *c*).

ER-Cisternen (Abb. 2 *ER*) und die kürzer- (Phycomyceten) oder längerfädigen (Asco- und Basidiomyceten) Mitochondrien (Abb. 2 *Mi*) liegen bevorzugt parallel der Hyphenlängsachse. Auch die Cristae mitochondriales sind meist längs orientiert. Diese Orientierung wird bei Permanganatfixierung (Pg)

Tabelle 1. Übersicht der Pilz-Arten und angewandten Untersuchungsmethoden sowie Hinweise auf die Abbildungsnummern

Art	Untersuchung		Apextyp	Abbildung
	lichtopt.	elektr.-opt.		
<i>Absidia glauca</i>	+	+	I	8a, b
<i>Chaetocladium brefeldii</i>	+	—	I (?)	
<i>Mucor hiemalis</i>	+	—	I	
<i>Mucor racemosus</i>	+	+	I	3c, d
<i>Mucor ramannianus</i>	+	—	I	1b
<i>Phycomyces blakesleeana</i>	+	+	I	1a; 6a, b; 8c, d
<i>Rhizopus nigricans</i>	+	+	I	2a; 3a, b; 6c; 8e, f
<i>Sporodinia grandis</i>	+	+	I	
<i>Thamnidium elegans</i>	+	—	I	
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	II	1c; 3g, b
<i>Aspergillus flavus</i>	+	—	II	
<i>Chaetomium globosum</i>	+	+	II	
<i>Neurospora crassa</i>	+	+	II	1e; 8g
<i>Neurospora sitophila</i>	+	+	II	2b; 3e, f
<i>Penicillium claviforme</i>	+	—	II	1d
<i>Penicillium notatum</i>	+	+	II	
<i>Podospora anserina</i>	+	+	II	8b
<i>Pyronema confluens</i>	+	—	II	
<i>Sordaria macrospora</i>	+	—	II	
<i>Fusarium culmorum</i>	+	+	II	1f; 6d, e
<i>Spicaria divaricata</i>	+	—	II	
<i>Gliocladium roseum</i>	+	—	II	
<i>Corticium vagum</i> ( <i>Rhizoglyphia solani</i> )	+	+	II	3i, k; 8i
<i>Polystictus versicolor</i>	+	+	II	1g; 2c; 4a—d; 5a—d; 7a—c; 9a—b; 10a und b, 11

artefziell verändert, tritt jedoch bei Aldehyd-Osmiumfixierung (GA, Os) stets eindeutig auf und darf als Charakteristikum pilzlicher Mitochondrien angesprochen werden.

Nach Pg-Fixierung lassen sich in allen Spitzenkörpern (Abb. 3 a, c, e, g, i) neben den größeren Vesikeln (Apexvesikel *ApV*) mit nicht oder wenig elektronenstreuendem Inhalt kleinere Mikrovesikel (*MV*) mit stark kontrastiertem Inhalt nachweisen. Umfangreiche Fixierungsvarianten (Abb. 4 a—l, Tabelle 2,

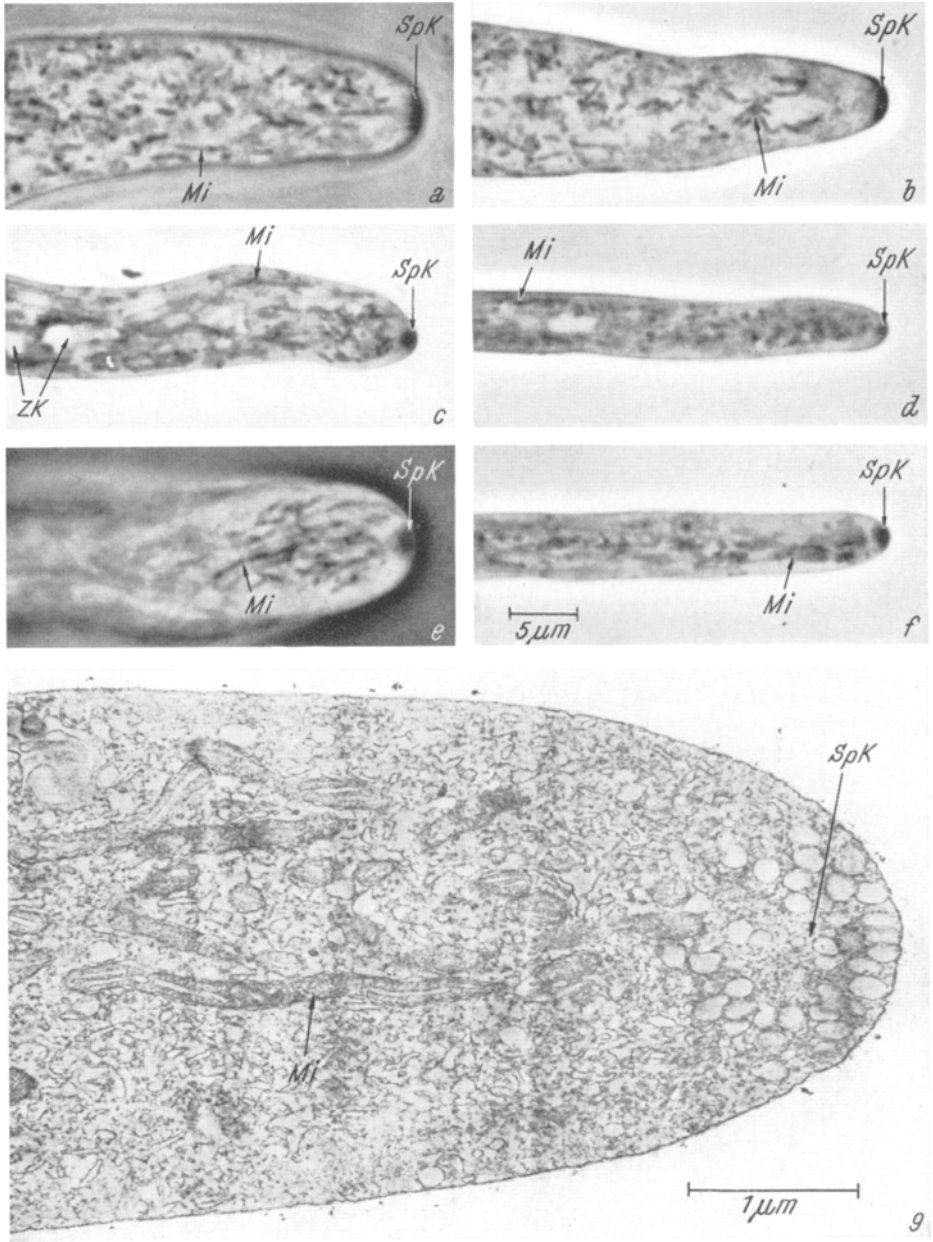


Abb. 1. Apices verschiedener Arten im Lebendbild und Elektronenmikrogramm. *a* *Phycomyces blakesleeana*; *b* *Mucor ramannianus*; *c* *Aspergillus niger*; *d* *Penicillium claviforme*; *e* *Neurospora crassa*; *f* *Fusarium culmorum*; *g* *Polystictus versicolor*. *Mi* = Mitochondrien; *SpK* = Spitzenkörper; *ZK* = Zellkern. *a-f* Phako 1900 : 1, *g* Elmi, GA-Fixierung, 22 500 : 1

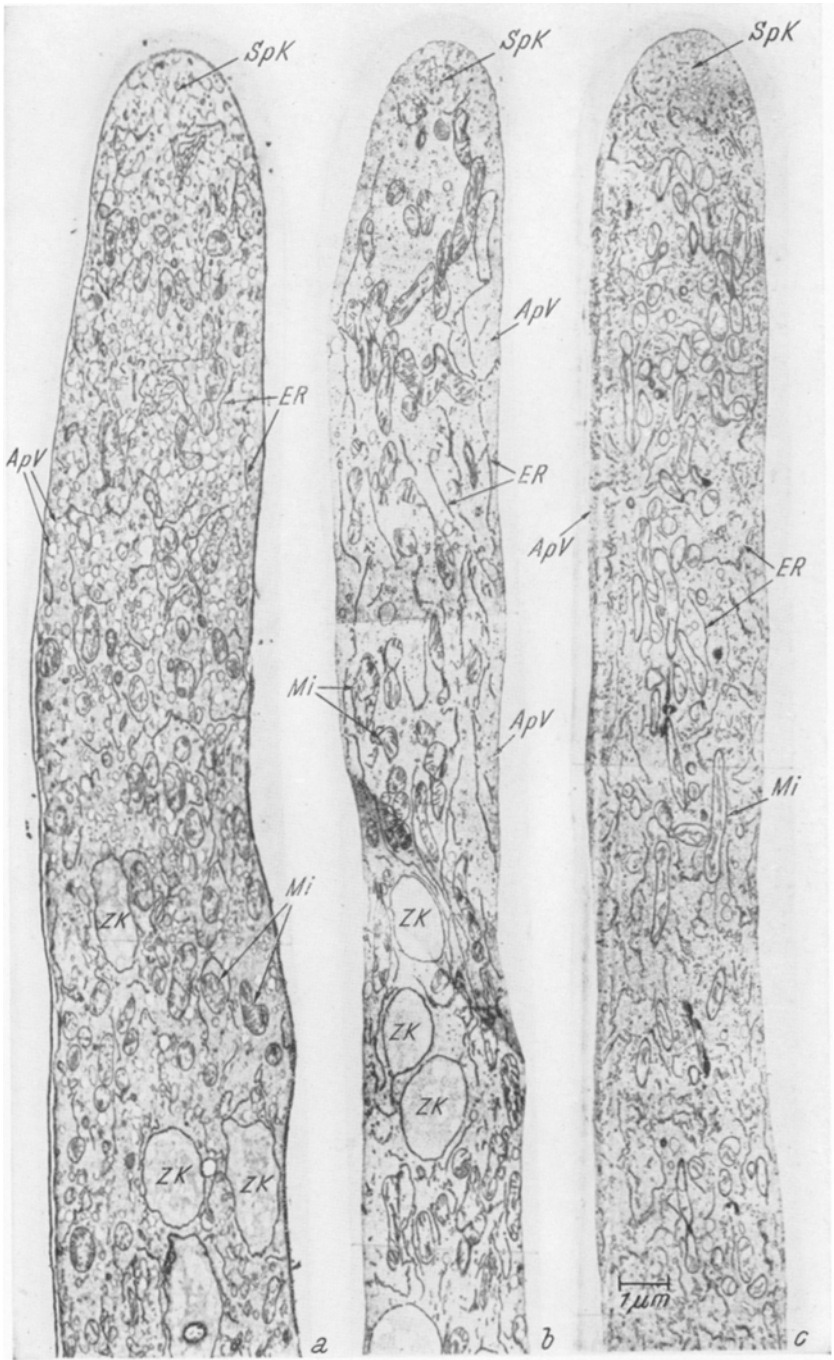


Abb. 2. Apikalregion nach Pg-Fixierung. *a* *Rhizopus nigricans*; *b* *Neurospora sitophila*; *c* *Polystictus versicolor*. Spk = Spitzenkörper; ZK = Zellkerne. Elmi 6750 : 1

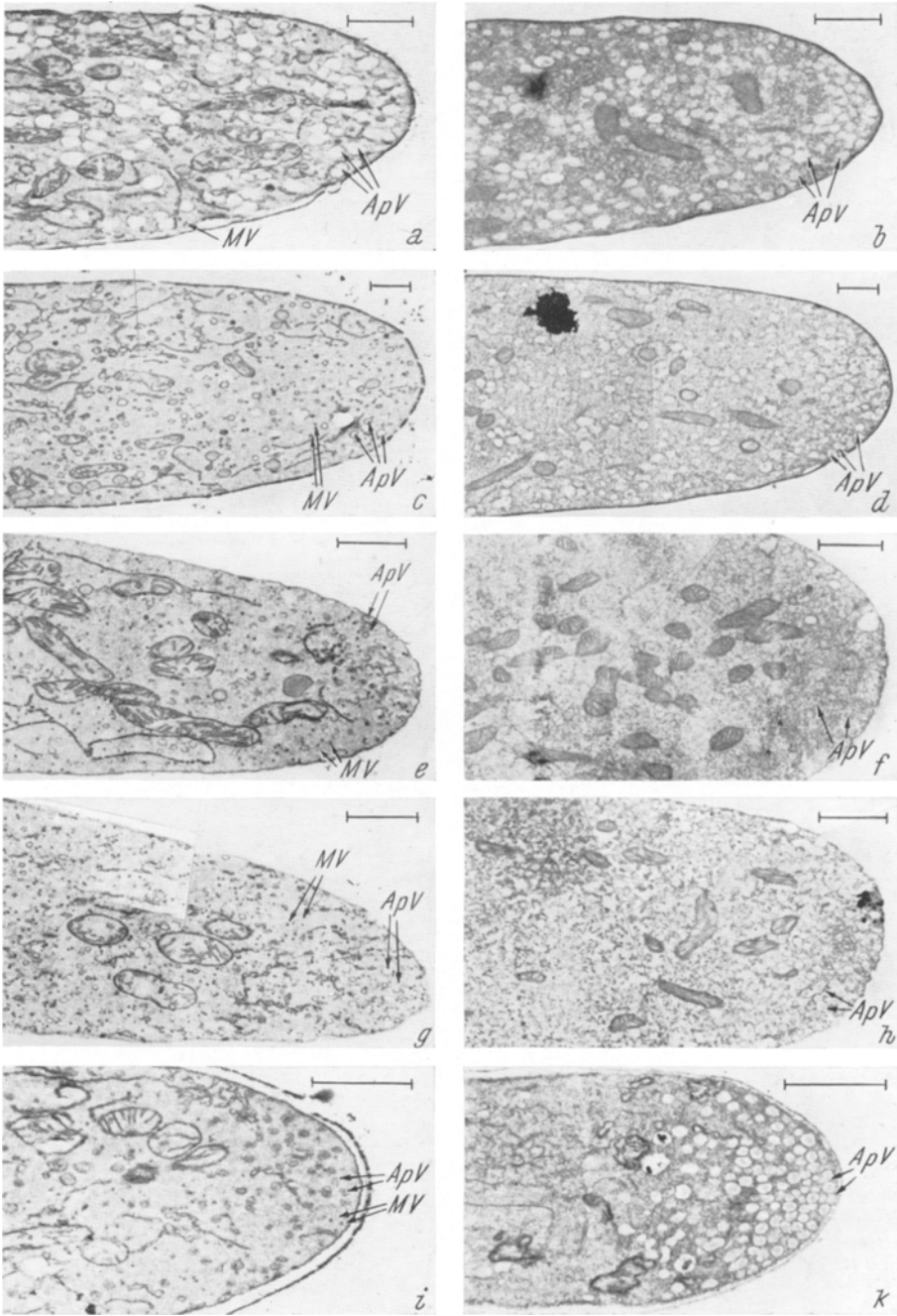


Abb. 3. Apices nach Pg- (a, c, e, g, i) und GA-Fixierung (b, d, f, h, k). a, b *Rhizopus nigricans*; c, d *Mucor racemosus*; e, f *Neurospora sitophila*; g, h *Aspergillus niger*; i, k *Corticium vagum* (*Rhizoctonia solani*). ApV = Apexvesikel; MV = Mikrovesikel. Elmi 5400—13 500 : 1



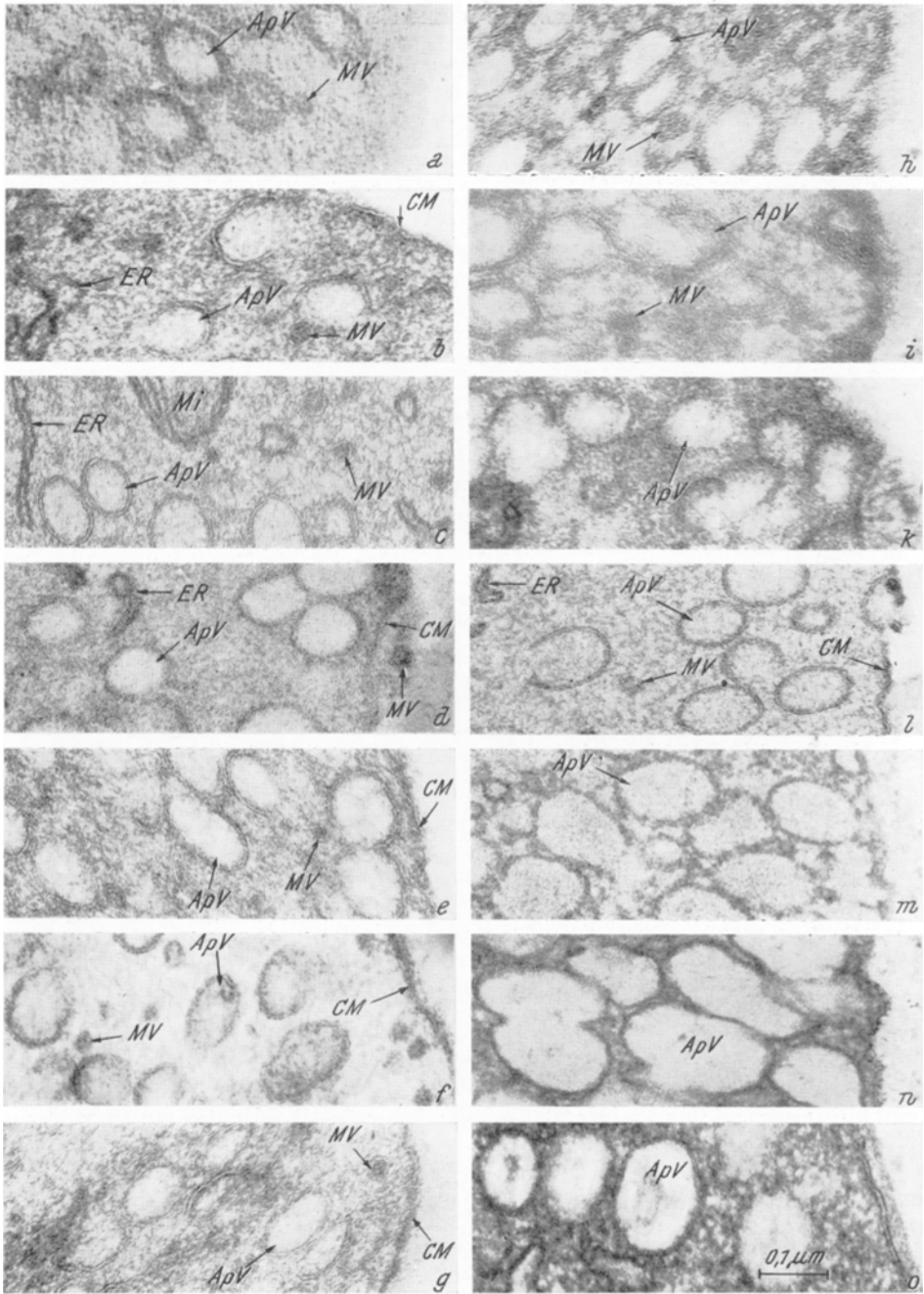


Abb. 4. Erhaltungszustand der Apexvesikel (ApV), Mikrovesikel (MV) und des Plasmamemmas (CM) im Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* nach Variation von Pg- (a—l), OsO<sub>4</sub>- (m) sowie GA-Fixierungen (n, o). (Näheres s. Tabelle 2.) Elmi 90 000 : 1

Nr. 1—11) sind ohne Einfluß. Die Vesikel liegen in weitgehend organellenfreiem Grundplasma.

Nach Os- oder GA-Fixierung bleiben nur die Apexvesikel erhalten (Abb. 3 *b, d, f, h, k*; Tabelle 2). Auch vielfältige Variation der Fixierungsbedingungen mit diesen Fixantien ändert nichts an diesem Ergebnis (Abb. 4 *m, n, o*; Tabelle 2, Nr. 12—14). Die stark kontrastierten Ribosomen, die in der gleichen Größenordnung wie der kontrastierte Inhalt der Mikrovesikel liegen, und die schlechtere Membranerhaltung nach Os-Fixierung sind wahrscheinlich die Hauptgründe, daß der Nachweis der Mikrovesikel unmöglich ist.

### 3.2. Präparative Einflüsse auf die Strukturhaltung

#### 3.2.1. Form des „Spitzenkörpers“

Die objektbedingten Unterschiede, die sich in diffus (Typ I) oder scharf begrenzten Formen (Typ II) manifestieren, können durch die Fixierung verwischt werden. Während bei Phycomyceten die Lokalisation der Apexvesikel nach Pg- und GA-Fixierung die gleiche bleibt (Abb. 2 *a, 3 a—d*), kommt es bei den sphäroiden Spitzenkörperformen nach Pg-Fixierung häufig zu einer Translokation der Vesikel (Abb. 3 *e, g, i, 10 a*). Der lebend identifizierbare Umriss des Spitzenkörpers ist dann im Elektronenmikrogramm nicht mehr zu erkennen. Nach GA- und Os-Fixierung bleibt die sphäroide Anordnung der Vesikel erhalten (Abb. 1 *g, 3 f, h, k, 10 b*). Bei diesen Fixierungen zeigt sich bei einigen Arten (Abb. 1 *g*) ein zentraler Bereich im Spitzenkörper, der wahrscheinlich reich an Mikro-, jedoch arm an Apexvesikeln ist.

Tabelle 2 zeigt, daß die sphäroide Form bei *Polystictus versicolor* auch nach Pg-Fixierung erhalten bleiben kann, wenn die Puffersubstanzen (Tabelle 2, Nr. 4, 5) variiert werden oder die Osmolalität durch  $\text{Ca}^{++}$  bzw.  $\text{PO}_4$ -Ionen erhöht wird (Tabelle 2, Nr. 8, 10). Die Form wird gesprengt, wenn  $\text{Na}^+$  (Tabelle 2, Nr. 6) verwendet wird. Bei Os- (Tabelle 2, Nr. 12) oder GA-Fixierung (Tabelle 2, Nr. 13, 14) ist der Erhaltungszustand des Spitzenkörpers unabhängig von der Osmolalität der Fixierungslösung.

#### 3.2.2. Vesikelmembranen

Die Darstellung der Vesikelmembranen als dreischichtige Struktur bedarf der Stabilisierung mit Uranylazetat (Tabelle 2, Nr. 1—4). Mit Permanganat allein stellen sich die Membranen einschichtig dar, gleichgültig, ob Ionen zugesetzt wurden (Tabelle 2, Nr. 4) oder nicht (Tabelle 2, Nr. 1). Bei Mikrovesikelmembranen mißlingt die dreischichtige Darstellung in einigen Fällen auch, wenn Uranylazetat zugesetzt ist (Tabelle 2, Nr. 6, 8, 10).

Die besten für Membrandickenmessungen geeigneten Bilder ergeben sich, wenn Permanganat entweder in Leitungswasser (Tabelle 2, Nr. 3, Abb. 4 *c*) oder 0,005 mol Phosphatpuffer, pH 6,9 (Tabelle 2, Nr. 11, Abb. 4 *l*) gelöst wird. Die Ionenkonzentration des verwendeten Leitungswassers entspricht etwa der einer 0,005 mol. Pufferlösung.

Tabelle 2. Einfluß des Fixierungsmittels auf den Erhaltungszustand des Spitzenkörpers und seiner Komponenten bei *Polysictus versicolor*. — Fixierungszeit und Konzentration der Uranylacetatlösung (UA) sind von Nr. 1—11 gleichbleibend wie unter 2.3. b beschrieben. Bei Fixierung Nr. 14 ist nur die GA-Konzentration von 5% (Nr. 13) auf 2% herabgesetzt. Der übrige Präparationsgang ist gegenüber 2.3. c nicht verändert. — GA = Glutaraldehyd, Pg = KMnO<sub>4</sub>, ApV = Apexvesikel, MV = Mikrovesikel, S.-P. = Sörensenpuffer

Nr. Fixierung	Osmolalität	Spkp.-Form	ApV	MV	ApV-Membr.	MV-Membr.	ApV-Größe nm	ApV-Zahl/Spkp.	Abb.
1 2% Pg, Aqua dest.	0,22	—	—	+	—	—			4a
2 2% Pg, Aqua dest., UA	0,22	—	+	+	+	+			4b
3 2.3. b (s. Mat. u. Method.)	0,28	—	+	+	+	+	130—160	600—800	4c
4 2% Pg, Ver.-az.-Puffer	0,34	++	+	+	—	—	100—130		4d
5 2% Pg, Ver.-az.-Puffer, UA	0,34	+-	+	+	+	+			4e
6 2% Pg, 0,1 mol NaCl, UA	0,45	—	+	+	+	—	100—130		4f
7 2% Pg, 0,01 mol NaCl, UA	0,28	—	+	+	+	+			4g
8 2% Pg, 0,1 mol CaCl <sub>2</sub> , UA	0,48	+	+	+	—	—			4b
9 2% Pg, 0,01 mol CaCl <sub>2</sub> , UA	0,24	—	+	+	+	+			4i
10 2% Pg, 0,1 mol S.-P., UA	0,46	+	+	—	—	—			4k
11 2% Pg, 0,005 mol S.-P., UA	0,26	—	+	+	+	+	130—160		4l
12 2.3. a (s. Mat. u. Method.)	0,25	+	+	—	—	—	150—190	400—500	4m
13 2.3. c (s. Mat. u. Method.)	0,48	+	+	—	—	—	180—220		4n
14 2% GA, 0,005 mol S.-P.	0,17	+	+	—	—	—	160—180		4o

Tabelle 2 zeigt, daß eine Fixierung, die gleichzeitig die Form des Spitzenkörpers und alle Membranen einwandfrei darstellt, nicht gefunden wurde.

### 3.2.3. Form und Größe der Apexvesikel des Spitzenkörpers

Es soll hier vor allem über die Apexvesikel (ApV) berichtet werden, die Mikrovesikel werden in einer gesonderten Arbeit behandelt (GIRBARDT 1969).

Nach Permanganatfixierung sind die ApV kugelig, erscheinen jedoch, vorwiegend bedingt durch die Schnittstauchung, häufig oval und sind meist geplatzt (Abb. 4 *b, e*). Hohe Osmolalität der Fixierungslösung (Abb. 4 *f, b, k*) sowie GA- und Os-Fixierungen (Abb. 4 *m, n, o*) vermindern die Häufigkeit des Platzens. Bei Os-Fixierung sind die einzelnen ApV häufig deformiert, vor allem an der Peripherie des Spitzenkörpers (Abb. 1 *g, 4 m*). Nach GA-Fixierung treten Formen auf, die eine Fusion der Vesikel anzuzeigen scheinen (Abb. 4 *n*).

Die in Tabelle 2 angegebenen ApV-Größen sind Mittelwerte aus je 100 Messungen an Medianschnitten. Die Vesikel sind nach Pg-Fixierung deutlich kleiner als nach GA- und Os-Fixierung. Die Gründe hierfür sind sowohl im Platzen nach Pg- wie in der Fusionsneigung nach GA-Fixierungen zu suchen.

Bei der Auszählung der ApV werden alle, auch die peripheren Anschnitte der Vesikel gezählt und die Summe durch drei geteilt, da eine Vesikel durchschnittlich von drei Schnitten erfaßt wird.

Mit der Erhöhung der Größe der Einzelvesikel bei Os-Fixierung läuft eine Verminderung der Gesamtanzahl parallel, was wahrscheinlich auf Fusionsvorgänge zurückzuführen ist.

## 3.3. Membrantypen

### 3.3.1. *Polystictus versicolor*

Nach Pg-Fixierung lassen sich die membranösen Komponenten der Zelle vor allem durch die Unterschiede der unkontrastierten Membranmittelschicht differenzieren. Apexvesikel (Abb. 5 *a, ApV*), Mikrovesikel (Abb. 5 *a, MV*), Plasmalemma (Abb. 5 *a, CM*) und als Golgicisternen (Abb. 5 *b, GC*) angesprochene Strukturen (s. nächsten Abschnitt) zeigen eine nur selten von kontrastreicheren Zwischenstrukturen unterbrochene Mittelschicht. Diesem Typ gehören außerdem multivesikuläre Einschlüsse an (Abb. 9 *e, MVB*), auf die an anderer Stelle einzugehen sein wird (GIRBARDT 1969).

Bei einem zweiten Typ ist die unkontrastierte Mittelschicht periodisch unterbrochen, so daß die Membran in globuläre oder röhrlige Untereinheiten aufgelöst erscheint. ER-Membranen (Abb. 5 *b, c, ER*) sowie äußere und innere Mitochondrienmembranen (Abb. 5 *d*) besitzen eine solche Mittelschicht. Außerdem gehören diesem Typ die Membranen der Kernhülle und die nicht näher identifizierter Cytosomen an. Vakuolenmembranen variieren stark und stellen vielleicht einen Intermediärtyp dar.

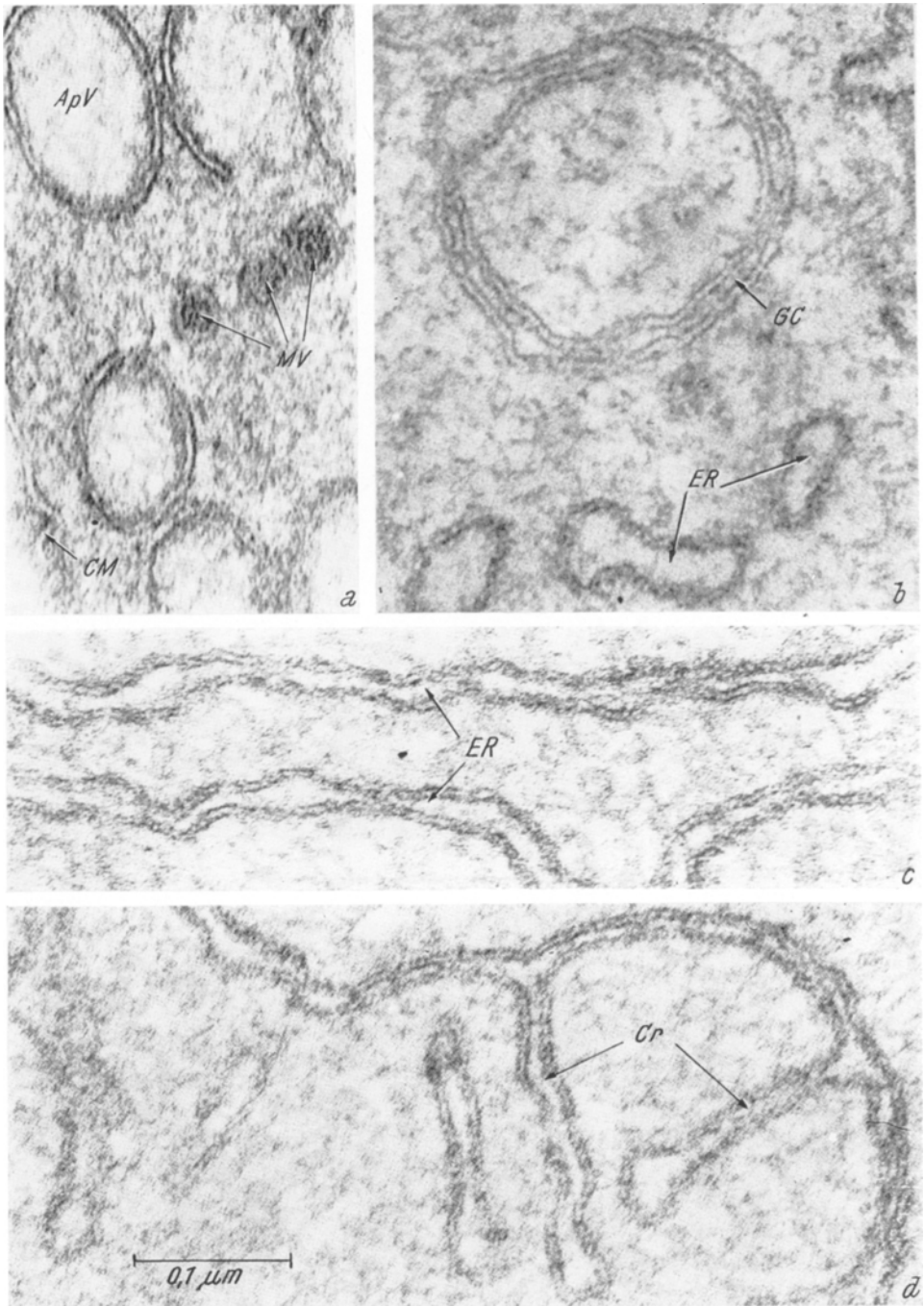


Abb. 5. Organellenmembranen von *Polystictus versicolor* nach Pg-Fixierung. ApV = Apexvesikel; CM = Plasmalemma; Cr = Cristae mitochondriales; ER = endoplasmatisches Retikulum; GC = Golgicisterne. Elmi 216 000 : 1

Schichtdickenmessungen ergeben (Abb. 6), daß sich die beiden Membrantypen auch quantitativ signifikant unterscheiden. Für den ersten Typ ist der gewogene Mittelwert für die unkontrastierte Mittelschicht 28,1 Å, während

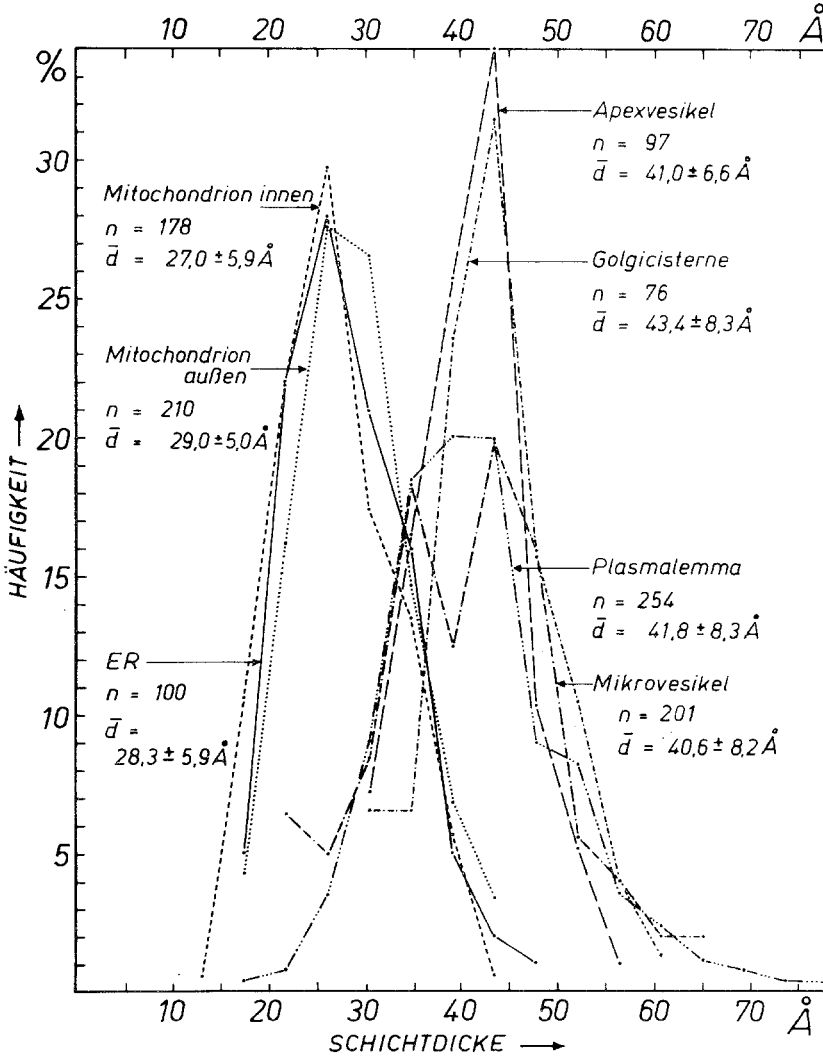


Abb. 6. Häufigkeit der Dicken der unkontrastierten Membranmittelschichten bei *Polystictus versicolor* nach Permanganatfixierung. Die Angaben für die Streuung der Mittelwerte  $\bar{d}$  sind als Streuungen der Einzelwerte berechnet.  $n$  = Anzahl der durchgeführten Messungen

er für den zweiten Typ bei 41,5 Å liegt. Nach Vergleich der gewogenen Mittelwerte beider Membrantypen mit Hilfe des  $t$ -Testes ist der Unterschied sehr gut gesichert (Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha < 0,001$ ).

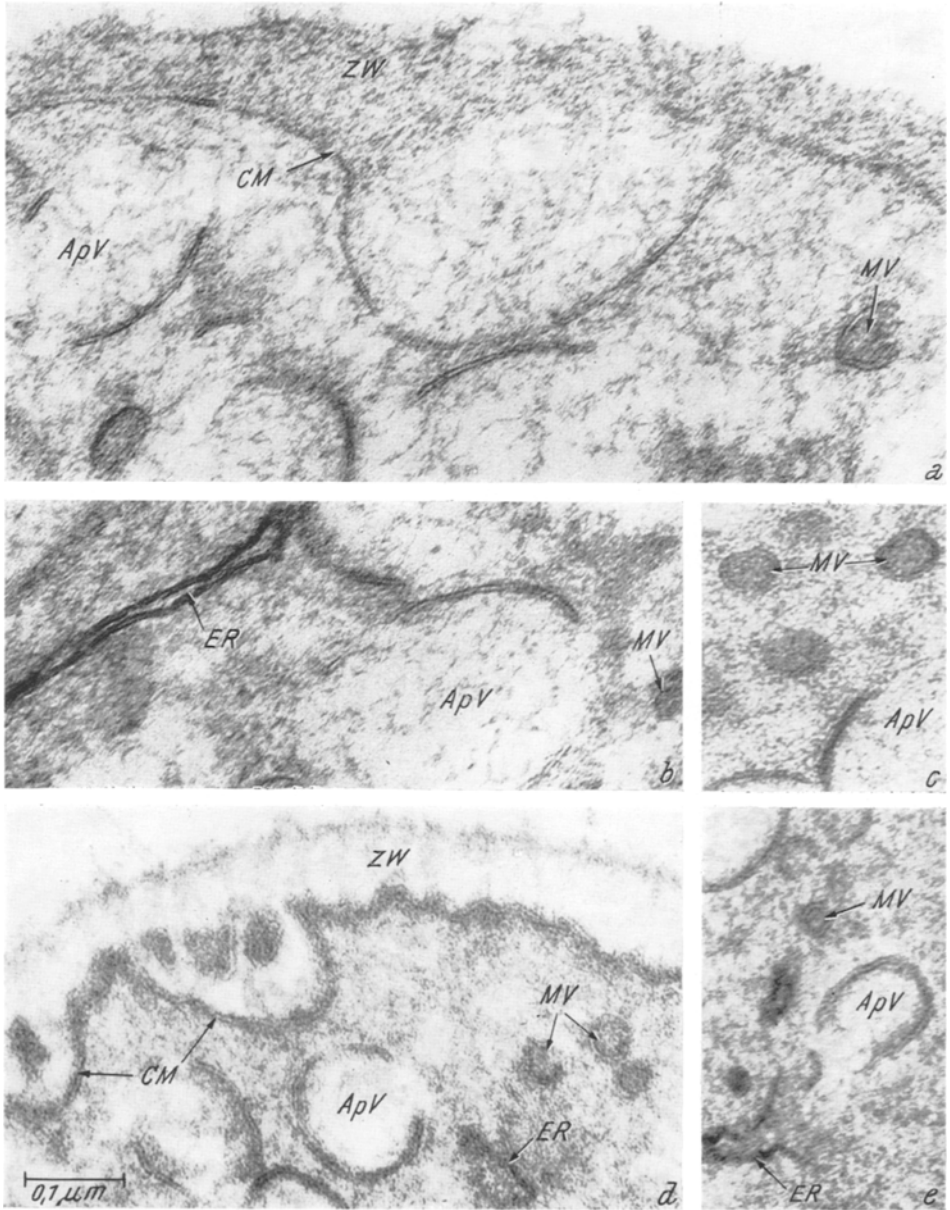


Abb. 7. Organellenmembranen von *a, b* *Phycomyces blakesleeanus*; *c* *Rhizopus nigricans*; *d, e* *Fusarium culmorum* nach Pg-Fixierung. ZW = Zellwand. Sonst Zeichen wie in Abb. 4. Elmi 135 000 : 1

Die große Streubreite der Werte für die Mikrovesikel rührt her von der Kleinheit dieser Organellen. Da deren Durchmesser nur etwa 400 Å beträgt, hängt es von der Schnittdicke ab, wie breit die unkontrastierte Schicht im Medianschnitt erscheint. Bei den meist napf- oder ringförmigen Golgicisternen sowie dem meist an Querschnitten gemessenen Plasmalemma

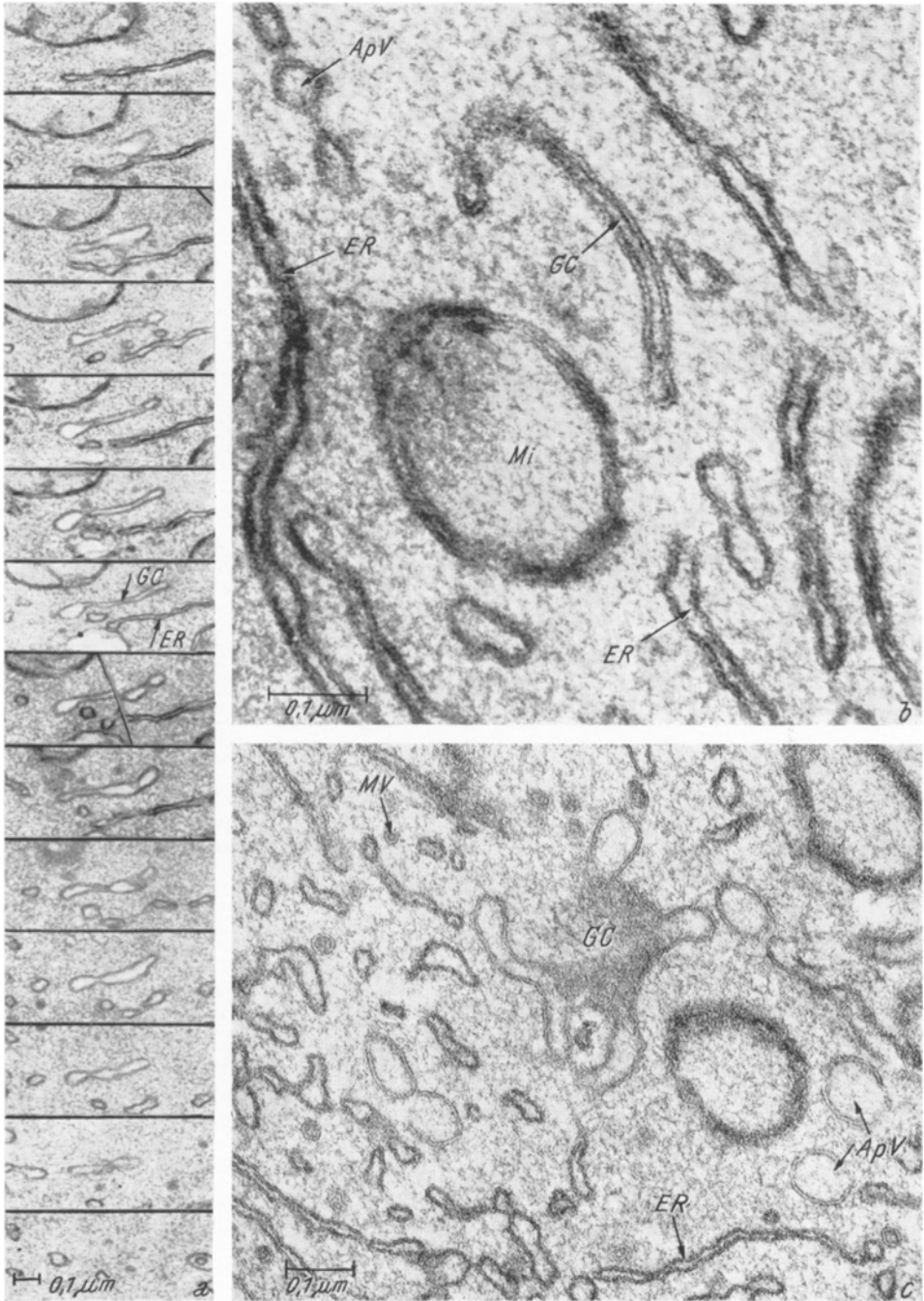


Abb. 8. Golgicisterne von *Polystictus versicolor* in Serien- (a), Längs- (b) und Flächenschnitt (c) nach Pg-Fixierung. Bezeichnungen wie in den vorherigen Abbildungen. Elmi  
a 36 000 : 1; b 135 000 : 1; c 90 000 : 1



wirkt sich die Schnittstauchung besonders aus. Bei Berücksichtigung der Schnittrichtung läßt sich die Streuung noch beträchtlich verringern. Im vorliegenden Falle wurde diese Korrekturgröße nicht berücksichtigt.

### 3.3.2. Andere Arten

Exakte Membranmessungen setzen optimale Fixierungsbedingungen voraus, die von Art zu Art verschieden sind. Die umfangreichen Fixierungsvarianten wurden nur für *Polystictus versicolor* durchgeführt. Für die übrigen Arten kann lediglich eine grobe Einschätzung gegeben werden.

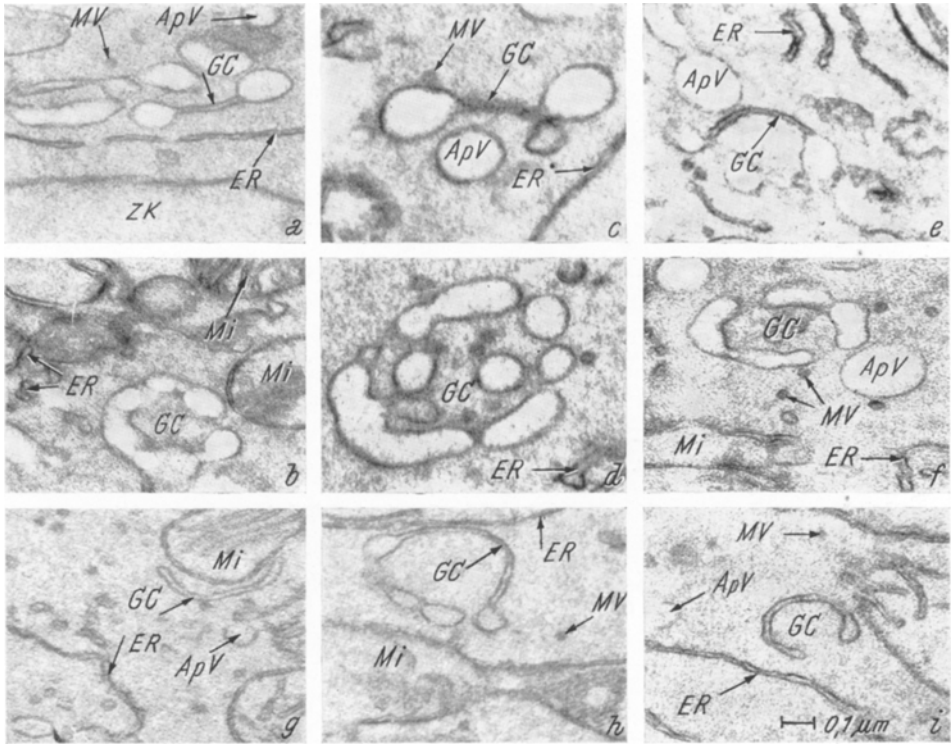


Abb. 9. Golgicisternen (GC) verschiedener Arten nach Pg-Fixierung. a, b *Absidia glauca*; c, d *Phycomyces blakesleeanae*; e, f *Rhizopus nigricans*; g *Podospora anserina*; h *Neurospora crassa*; i *Neurospora sitophila*. Elmi 45 000 : 1

Dickenunterschiede der unkontrastierten Mittelschicht sind bei Phycomyceten wenig auffällig (Abb. 7 a—c). Gelegentlich sind die kontrastierten Schichten der ER-Membranen (Abb. 7 b) deutlich hervorgehoben. In anderen Fällen ist eine Unterscheidung nicht möglich (Abb. 9 a—f). Auch bei Ascomyceten und *Fungi imperfecti* ist eine Differenzierung nur in wenigen Fällen evident (Abb. 7 d, e), häufig läßt sich kein Unterschied feststellen (Abb. 9 g—i). Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um sicherzustellen, ob die für *Polystictus versicolor* gefundenen Membranverschiedenheiten auch bei anderen Pilzen vorkommen.

### 3.4. Golgi-Cisternen

Golgi-Dictyosomen in der typischen Form sind bisher nur in seltenen Fällen bei Pilzen nachgewiesen worden (FULLER *et al.* 1965, HAVELKOVA *et al.* 1966, GROVE *et al.* 1967 a, 1968 a). Für die vegetativen Zellen von *Polystictus versicolor* darf auf Grund des vorliegenden umfangreichen Untersuchungsmaterials ausgeschlossen werden, daß echte Dictyosomen vorhanden sind. Dagegen werden Strukturen gefunden, die einer Einzelcisterne eines Dictyosoms entsprechen.

Die Golgicisterne besitzt eine Membran mit dicker Mittelschicht (Abb. 6). Die beiden kontrastierten Außenschichten sind, verglichen mit ähnlich aussehenden ER-Cisternen, schwächer dargestellt und besitzen glattere Oberflächen (Abb. 8 b). — Die Golgicisternen sind geschlossene Gebilde unterschiedlicher Größe, die gelegentlich lokal gehäuft, jedoch nicht stapelförmig geordnet vorkommen. Sie sind meist unterschiedlich stark gekrümmt (Abb. 8 b), jedoch gelegentlich auch gestreckt (Abb. 8 a) und stehen nicht in direkter Verbindung mit dem ER. An den Rändern sind sie meist an mehreren Stellen blasig aufgetrieben, wie Serien- (Abb. 8 a) oder Flächenschnitte (Abb. 8 c) deutlich zeigen. Das übrige Lumen der Golgicisterne besitzt, wiederum im Gegensatz zu ER-Cisternen, relativ konstanten Durchmesser (Abb. 5 b, 8 b).

Auch in den vegetativen Zellen der untersuchten Phyco- (Abb. 9 a, c, e) und Ascomyceten (Abb. 9 g—i) sind ähnlich geformte Strukturen nachzuweisen. Sie bilden bei Phycomyceten häufig hohlkugelige Komplexe (Abb. 9 b, d, f). Das vorliegende Material reicht nicht aus um sicherzustellen, ob auch diesen Gattungen echte Dictyosomen fehlen. Zur Feststellung des Hauptcharakteristikums der Einzelcisterne (dicke Membranmittelschicht) reicht die Güte der Fixierung nicht aus.

### 3.5. Verteilung der Apexvesikel und Golgicisternen in der Hyphenzelle

Grundlage für die Bestimmung der Vesikel- und Golgicisternenzahl pro Raumeinheit (ApV- und GC-Konzentration) ist eine Volumenberechnung, die auf der Annahme einer mittleren Schnittdicke von 500 Å basiert. Für diesen Schnittdickenwert sprechen: a) Die Interferenzfarbe der verwendeten Schnitte im Reflex ist Silber bis Grau. b) Probeweise mit dem „Interphako“ des VEB Carl Zeiss, Jena, durchgeführte Schnittdickenbestimmungen, die mit etwa  $\pm 50$  Å Genauigkeit möglich sind, ergaben bei der Vermessung von 115 Schnitten einer Serie eine mittlere Schnittdicke von 470 Å. c) Die in Vestopal eingebetteten Hyphen besitzen nach Permanganatfixierung einen Durchmesser von  $3,5 \mu\text{m}$ . Die Schnittzahl genau parallel längsgeschnittener Hyphen liegt zwischen 50 und 90 pro Hyphe, was einer Schnittdicke von etwa 700—400 Å entspricht.

Die „Region“ in Tabelle 3 ist durch ihren Abstand von der Spitze charakterisiert. Angegeben sind die Werte für den Mittelabstand. So ist z. B. für die Region 10—20  $\mu\text{m}$  der Wert 15  $\mu\text{m}$  eingetragen.

Die Werte für die Konzentration der ApV und GC wurden wie folgt ermittelt: a) In Längsschnittserien, die eine Hyphenlänge von etwa 100  $\mu\text{m}$  erfassen, werden die ApV im Spitzenkörper und in 10 oder 20  $\mu\text{m}$  langen Hyphenabschnitten ausgezählt. Zwischen zwei aus-

gewerteten Schnitten liegen mindestens je zehn Schnitte, so daß Doppelzählungen von Vesikeln ausgeschlossen sind. b) Um die Konzentration von ApV auch in weiter rückwärts gelegenen Regionen einer Hyphenzelle zu erfassen, werden die ApV in je 20—30 Serienquerschnitten der vorher im Block markierten Regionen ausgezählt. Die berechnete mittlere Vesikelzahl pro Schnitt wird durch drei dividiert. Die Querschnittserien repräsentieren somit 1—1,5  $\mu\text{m}$  lange Stichproben (= 20—30 Schnitte) aus der betreffenden Region. c) Zur Feststellung der Golgi-Cisternen-Konzentration muß deren absolute Zahl durch Rekonstruktion aus Serienquerschnitten ermittelt werden, da die Größe der Cisternen stark variiert. Die Anzahl der ApV, GC wird bei allen drei Erfassungsverfahren auf 1  $\mu\text{m}^3$  rechnerisch bezogen.

Tabelle 3. Anzahl der Apexvesikel (ApV) und Golgi-Cisternen (GC) in verschiedenen Regionen der Spitzenzelle von *Polystictus versicolor*

Region	ApV/ $\mu\text{m}^3$	GC/ $\mu\text{m}^3$
Spitzenkörper	200—400	0
15 $\mu$	10	2,0
25 $\mu$	6,3	
40 $\mu$	2,6	0,6
60 $\mu$	1,6	
80 $\mu$	2,0	0,4
100 $\mu$	1,5	
150 $\mu$	2,3	0,9
200 $\mu$	1,0	0,3
250 $\mu$	0,3	0
300 $\mu$	0,6	0
350 $\mu$	0,8	0,4
400 $\mu$	1,1	0,3
450 $\mu$	1,2	0,1
500 $\mu$	0,8	0,1

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Zählungen an 195 Schnitten (zwei Schnittserien) zusammengefaßt. Danach sind ApV und GC in der gesamten Spitzenzelle vorhanden. Die ApV-Konzentration sinkt rasch auf einen Wert um 2 ApV/ $\mu\text{m}^3$ , steigt in der Region 150  $\mu\text{m}$  noch einmal schwach an und bleibt dann um 1 ApV/ $\mu\text{m}^3$ . Golgicisternen sind im Spitzenkörper nicht vorhanden, treten jedoch unmittelbar dahinter gehäuft auf. Auch ihre Konzentration steigt in der Region 150  $\mu\text{m}$  noch einmal schwach an und fällt dann auf einen Wert um 0,3 GC/ $\mu\text{m}^3$ .

In der Region 150  $\mu\text{m}$ , die sowohl einen Anstieg in der ApV- wie GC-Konzentration zeigt, liegen die beiden Zellkerne, die auch in einer der zur Auswertung verwendeten Serien angeschnitten waren.

### 3.6. Verhalten der Apexvesikel bei Induktion und Sistierung des Wachstums

In der Schnalle der Basidiomyceten lassen sich sowohl Wachstumsinduktion wie -sistierung verfolgen, da der Schnallenauswuchs nach relativ kurzer Zeit (8—10 min) sein Wachstum

wieder einstellt. Lichtoptisch ist nicht zu entscheiden, ob bei der Sistierung die Bestandteile des Spitzenkörpers nur verlagert oder aufgelöst werden (GIRBARDT 1957). Zur Klärung dieser Frage kann nur OsO<sub>4</sub>- oder GA-Fixierung eingesetzt werden, da Pg-Fixierung zur Verlagerung der ApV führt (vgl. Abschnitt 2.1.), so daß ihre vitale Lokalisation nicht erkennbar ist.

Während der Schnalleninduktion findet eine geringe Häufung der Apexvesikel im gesamten Hyphencytoplasma der Region des auswachsenden Schnallenhöckers statt. Zur Akkumulation der ApV, also zur Bildung eines Spitzenkörpers, kommt es erst etwa eine Minute später, wobei die Masse der ApV exzentrisch verlagert wird (Abb. 10 a), was dem Lebendbild (GIRBARDT 1957) entspricht. Dann zeigt der Schnallenhöcker bis unmittelbar vor Sistierung seines Wachstums das typische Apexbild einer wachsenden Hyphe (Abb. 10 d).

Wächst die Schnalle anomal und stellt dann ihr Wachstum ein, sind die ApV im Cytoplasma der Schnalle zerstreut, die Apikalregion besitzt dagegen nur noch wenige ApV (Abb. 10 b, c). Ist die Kernteilung in einer normal gewachsenen Schnalle in Gang gekommen, ist das gesamte Schnallencytoplasma praktisch frei von ApV (Abb. 10 e), während Mikrovesikel, auch in Form multivesikulärer Körper (Abb. 10 e MVB), noch reichlich vorhanden sind.

Deckglasauflage bringt den Spitzenkörper innerhalb einer Minute zum Verschwinden. Daher kann ein Hyphenapex, in dem dieses Verschwinden stattfindet, lebend unmittelbar vor der Fixierung photographisch registriert werden (Abb. 10 f). Die Zelle zeigt im Ultradünnschnitt, daß die ApV hinter der Spitze gehäuft sind (Abb. 10 g, h), also sehr wahrscheinlich nur nach rückwärts verlagert werden, ohne sich jedoch aufzulösen.

### 3.7. Exo- oder Endocytose?

Die Membranen der ApV und MV gehören zum gleichen Membrantyp wie das Plasmalemma, könnten daher sowohl zum Aufbau verwendet werden (Exocytose) wie Abkömmlinge desselben (Endocytose) sein. Gegen eine Endocytose sprechen folgende Befunde:

a) Wird dem Agar-Nährbodenfilm, auf dem die Hypen vor der Fixierung wachsen, Thorotrast im Verhältnis 1 : 1 zugegeben, so könnten die Thoriumpartikel endocytotisch aufgenommen werden. Die Partikel bleiben nach der Fixierung im Agar erhalten, werden jedoch von der Zelle nicht aufgenommen (Abb. 11 a). Allerdings läßt die Möglichkeit, daß die Partikel die Schleimschicht der Zellwand nicht zu passieren vermögen (SCHMID *et al.* 1967) eine eindeutige Entscheidung, ob sie bis zum Plasmalemma gelangt sind, nicht zu.

b) In Gram-negativen Bakterien läßt sich das Plasmalemma mit Hilfe der Reduktion von Tellurit darstellen (VAN ITERSON *et al.* 1964). Auch bei *Polydicticus versicolor* ist das Plasmalemma stark kontrastiert, wenn der Pilz auf Substrat wächst, das 0,01% K<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub> enthält (Abb. 11 b). Die Apexvesikel bleiben unkontrastiert, was gegen ihre Herkunft vom Plasmalemma spricht.

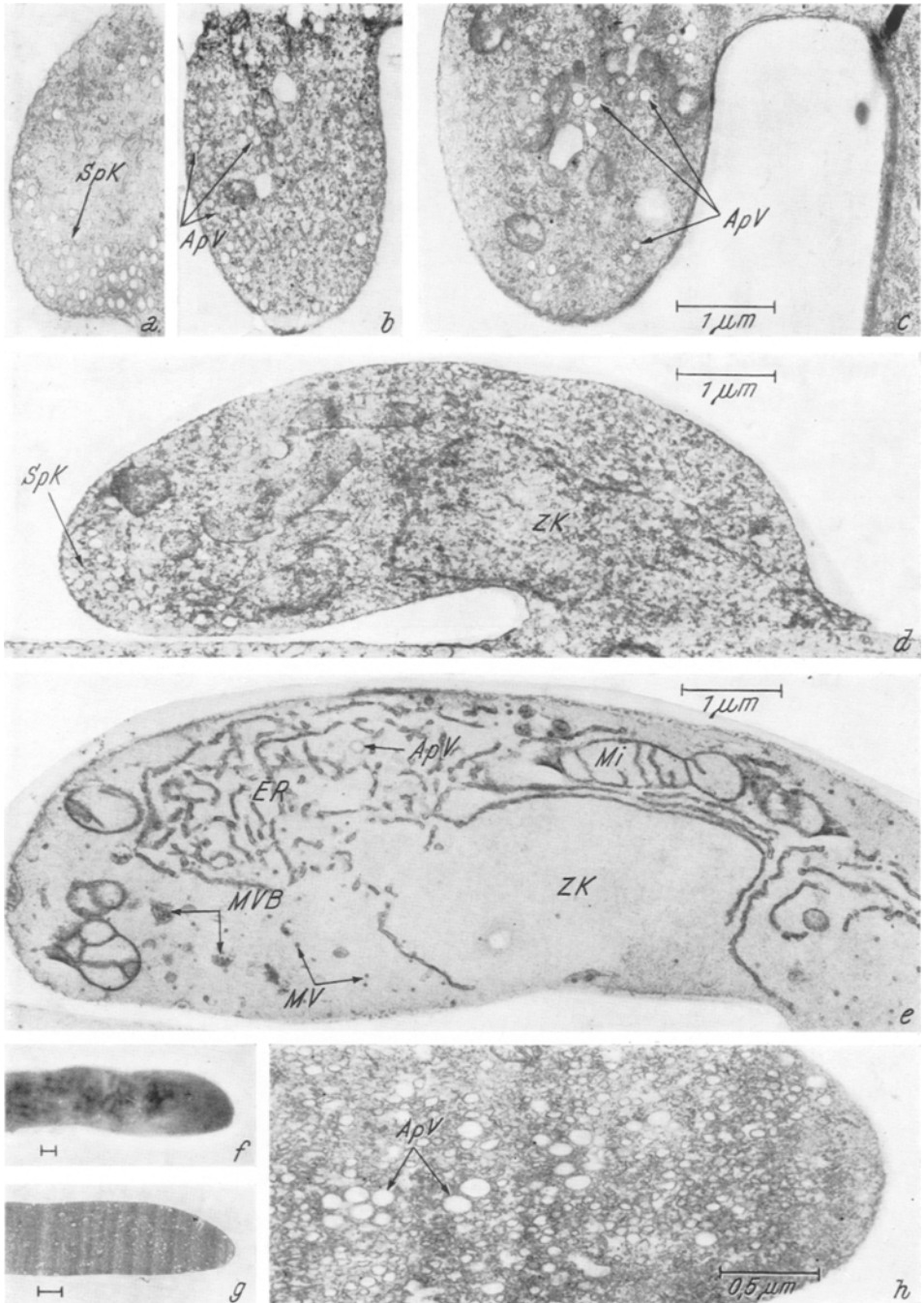


Abb. 10. Schnalle von *Polystictus versicolor* nach GA- (a—d), Pg- (e) und Os-Fixierung (g, h). Lebendaufnahme (f). Exzentrisch verlagertes Spitzenkörper (SpK) bei Beginn des Schnallenauswuchses (a), Verlagerung der Apexvesikel (ApV) bei Wachstumsanomalien (b, c) und nach experimenteller Sistierung des Wachstums (f—h). Verhalten der ApV vor (d) und nach (e) der natürlichen Sistierung bei Fertigstellung der Schnalle. Elmi a—c 13 500 : 1; g 3600 : 1; h 27 000 : 1; Phako lebend f 1800 : 1

Gelegentlich, besonders nach GA-Fixierung vorkommende myeloide Einstülpungen des Plasmalemmas (Abb. 11 *b*, Pfeil) sind dagegen stark kontrastiert.

c) Die zahlreichen Invaginationen des Plasmalemmas enthalten fast stets Mikrovesikel („Lomasomen“). Würden beide Vesikelarten gemeinsam eingeschleust, wäre zu erwarten, daß im Inneren der den Spitzenkörper auf-

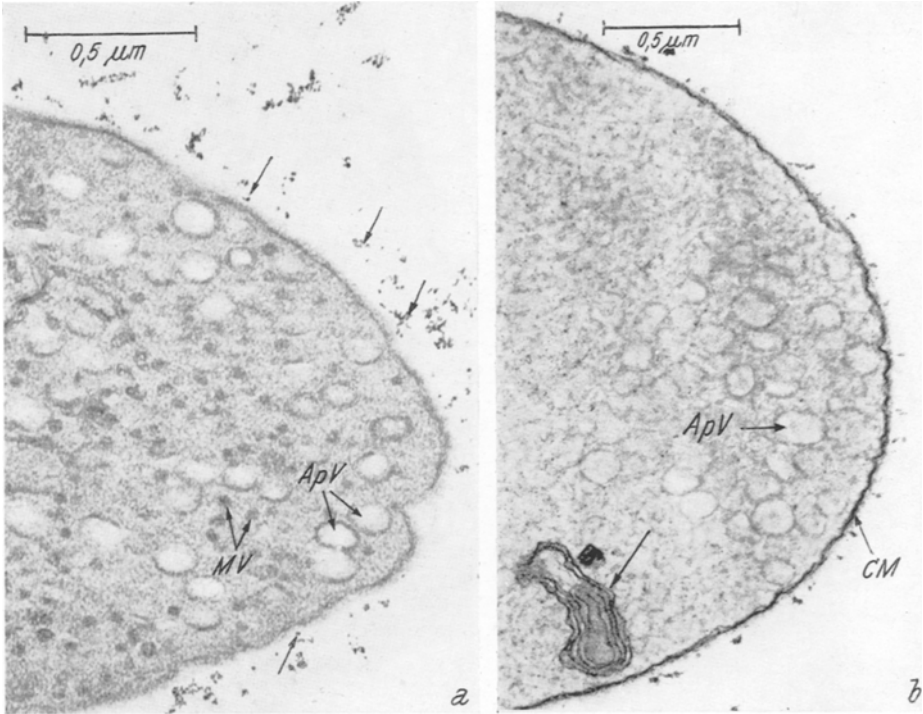


Abb. 11. Apex von *Polystictus versicolor* nach Wachstum auf Thorotrast- (*a*) und  $K_2TeO_3$ -haltigem (*b*) Substrat. Die Thoriumpartikel (Pfeile in *a*) werden nicht aufgenommen, Apexvesikel (*ApV*) und Mikrovesikel (*MV*) sind frei von ihnen. Reduziertes Tellurit kontrastiert das Plasmalemma (*CM* in *b*) und Einstülpungen derselben (Pfeil), die Membran der Apexvesikel bleibt unkontrastiert. *a* Pg-Fixierung, *b* GA-Fixierung. Elmi 45 000 : 1

bauenden Apexvesikel zumindest gelegentlich Mikrovesikel vorhanden sind. Dies konnte nie beobachtet werden.

### 3.8. Das Modell der Apikalregion<sup>1</sup>

Grundlage für die Erstellung des Modells ist die Rekonstruktion der Längsschnittserie einer Permanganat-fixierten Hyphe, die auf 99 Schnitten (errechnete mittlere Schnittdicke 274 Å) 85% des Hyphenvolumens und 98% der

<sup>1</sup> Für die zeichnerische Gestaltung des Modells und wichtige stereologische Vorarbeiten sei Herrn H. HÄDRICH bestens gedankt.

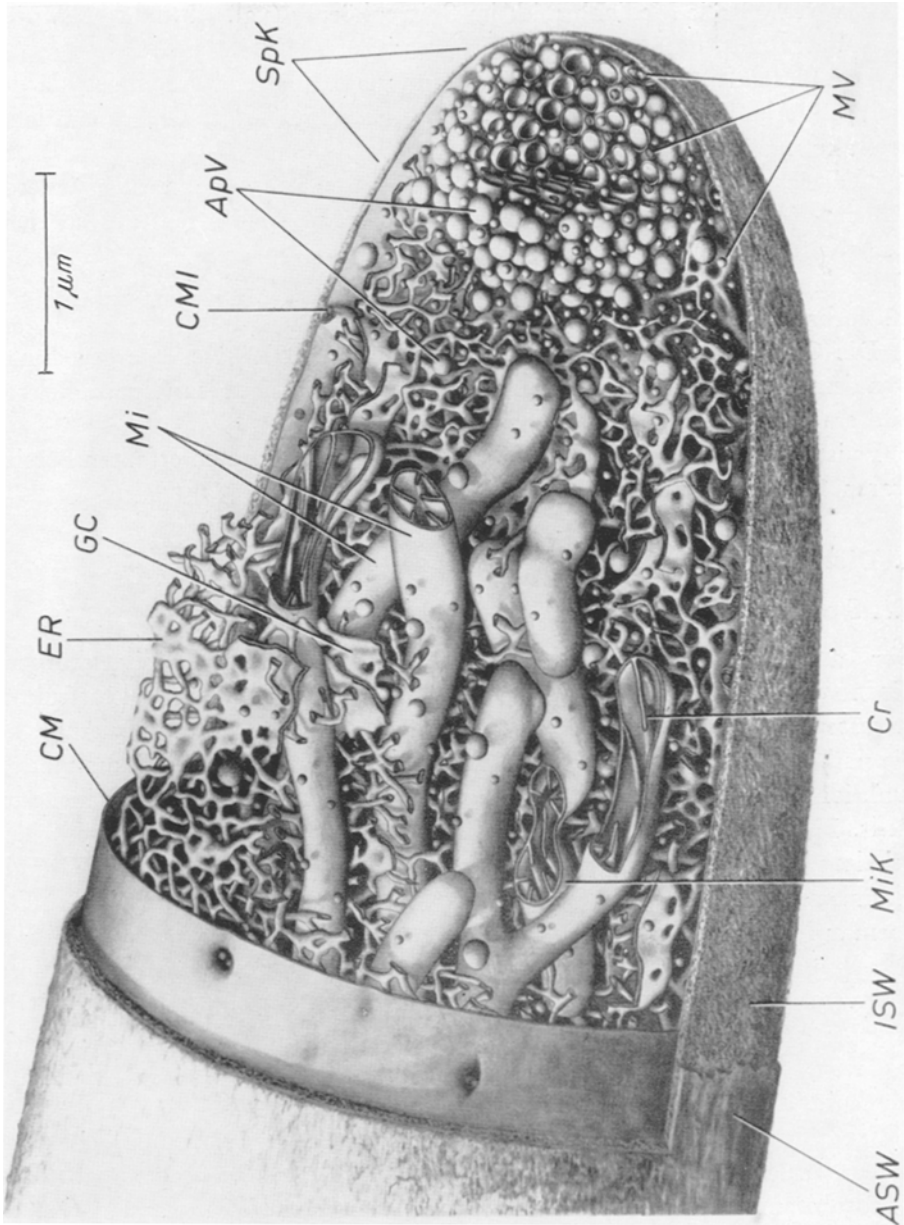


Abb. 12. Modell der Apikalregion von *Polystictus versicolor*. *ApV* = Apexvesikel; *ASW* = äußere Schicht der Zellwand; *CM* = Plasmalemma; *CMI* = Plasmalemmainvagination („Lomasom“); *Cr* = Cristae mitochondriales; *ER* = endoplasmatisches Retikulum; *GC* = Golgisches Retikulum; *ISW* = innere, fibrilläre Schicht der Zellwand; *Mi* = Mitochondrion; *MiK* = Mitochondrienkrümmung; *MV* = Mikrovesikel; *SpK* = Spitzenkörper

Spitzenkörperregion erfaßt. Für die hier vorgelegte Gestaltung wurden folgende Korrekturen vorgenommen:

a) Für den äußeren Umriß des Spitzenkörpers (*SpK*) wurde die sphäroide Form (GA-Bild), für die Einzelvesikel (*ApV* und *MV*) das Pg-Bild zugrunde gelegt (vgl. Abschnitt 2).

- b) Der vesikelfreie Medianbereich im Spitzenkörper (vgl. Abschnitt 2) wurde nicht dargestellt, da seine vitale Existenz noch fraglich ist.
- c) Das Plasmalemma wurde der Zellwand glatt anliegend gezeichnet, da der wellige Verlauf, wie ihn das elektronenoptische Bild zeigt, als Präparationsartefakt angesehen wird.
- d) Die Darstellung der Zellwand als geschichtete Struktur mit einer äußeren Schleim- (*ASW*) und einer inneren Fibrillenschicht (*ISW*) geht auf spezielle Zellwanduntersuchungen zurück (STRUNK 1963).
- e) Die im Modell sichtbaren sieben Mitochondrien (*Mi*) sind nur ein Teil der 22 vorhandenen.
- f) Die Cristae mitochondriales sind vorwiegend als Längscristae gezeichnet, was dem durch Lebend-Tot-Vergleich als realer anzusehenden Glutaraldehydbild entspricht.
- g) Es ist nur eine Golgicisterne (*GC*) gezeichnet. Im gesamten erfaßten Bereich waren 15 vorhanden.

## 4. Diskussion

### 4.1. Spitzenkörper

Der aus der Lichtmikroskopie stammende Terminus „Spitzenkörper“ (BRUNSWICK 1924) läßt ein Organell mit vielleicht besonderer Ultrastruktur erwarten. Dies ist nicht der Fall. Gegenwärtig ist jedoch noch unbekannt, ob die nachgewiesene unterschiedliche Form und Größe der Vesikelakkumulation funktionelle Bedeutung besitzt oder nur eine Summation der Einzelvesikel darstellt. Bis zur Klärung dieser Frage sollte der Begriff „Spitzenkörper“ beibehalten werden. Er ist jetzt morphologisch zu definieren als ein Grundplasmaareal im Apex von Pilzhypen, das in unterschiedlicher Größe und Form auftritt und aus Apexvesikeln, Mikrovesikeln und Ribosomen besteht.

Die Befunde über das Fehlen von Spitzenkörpern bei Zygomyceten und Oomyceten (MCCLURE *et al.* 1968, THORNTON 1968) sind verständlich, da diese Arten keine *sphärischen* Formen besitzen und es letztlich eine Definitionsfrage ist, ob die kalottenförmige Anordnung der Vesikel im Typ I (vgl. Abschnitt 1) als „Spitzenkörper“ bezeichnet werden soll.

Ein spezifisches Korpuskel (BARTNICKI-GARCIA *et al.* 1968) konnte bei keiner der untersuchten Arten gefunden werden. Lokale Ablagerungen von Zellwandsubstanz, die sich zapfenförmig der vorhandenen Zellwand auflagern und dem Korpuskel ähneln, treten bei *Polystictus versicolor* etwa 2—5 min nach Sistierung des Wachstums in der Apikalregion auf.

Die äußere Form des Spitzenkörpers und seine Position im Apex scheinen maßgeblich durch den Turgor der Zelle und gerichteten aktiven Transport der Apexvesikel bestimmt zu werden. Für diese Vorstellung sprechen:

- a) Bei Wachstumssistierung durch Lichtchock oder Deckglasauflage zeigt das Grundplasma eine nach etwa 30—60 sec einsetzende Erhöhung der Brechzahl



(GIRBARDT 1957 a). Dies dürfte eine Dehydratisierung andeuten und durch Permeabilitätsänderungen des Plasmalemmas hervorgerufen werden. Der Austritt von Wasser bzw. niedermolekularer Bestandteile aus der Zelle führt zu Turgeszenzverlust, und die Apexvesikel werden nicht mehr in der äußersten Spitze zusammengepreßt. Der beobachtbare Verlust der sphäroiden Form des Spitzenkörpers und die anschließende Zufallsverteilung der Apexvesikel in einem größeren Bereich des Apikalplasmas (vgl. Abb. 10 *f, g, h*) sind die zu erwartenden Folgen.

b) Glutaraldehydfixierung führt zu einer augenblicklich einsetzenden Vernetzung von Proteinen. Die unter Druck stehenden Apexvesikel scheinen daher nicht mehr die Möglichkeit zu besitzen, ihre Position zu verändern (Tabelle 2). Bei Permanganatfixierung kommt es dagegen zu einem explosionsartigen Zerfall des Spitzenkörpers, so daß seine Apexvesikel in einem größeren Bereich der Spitze verstreut liegen. Bei Erhöhung der Osmolalität des Fixierungsmediums (Tabelle 2, Nr. 8, 10) kann dieser Effekt verhindert werden. Unerklärt bleibt, warum dies mit NaCl nicht möglich ist (Tabelle 2, Nr. 6). Die beobachtete Deformation der Apexvesikel nach GA-Fixierung darf wahrscheinlich nicht als Argument angeführt werden. Der im Innern des Spitzenkörpers nach GA-Fixierung auftretende vesikelfreie Raum (Abb. 1 g) spricht dafür, daß die äußeren Vesikel des Spitzenkörpers früher stabilisiert werden und der im Innern noch herrschende Druck die Apexvesikel nach außen preßt und deformiert.

c) Die bei Krümmungen auftretende exzentrische Verlagerung des Spitzenkörpers (Abb. 10 *a*) könnte die Folge lateral unterschiedlicher metabolischer Aktivität sein, die zu gerichteten Strömungen in der stark kompartimentierten Apexregion führen. Die Reaktionskette endet bei unterschiedlich hoher Syntheserate für die Zellwandsubstanz, die die sichtbar werdende Krümmung der Hyphe verursacht.

#### 4.2. M e m b r a n t y p e n

Es ist nicht ohne Gefahr, die unkontrastierte Mittelschicht einer Membran als Charakteristikum für einen „Membrantyp“ heranzuziehen. Einmal besteht weitgehend Übereinstimmung in der Annahme, daß die Kohlenwasserstoffketten der Membranlipide in „flüssigem“ Zustand sich befinden (KAVANAU 1965, CHAPMAN *et al.* 1966) und daher besonders fixationslabil sein dürften. Zum anderen hat sich gezeigt (SJÖSTRAND 1968), daß eine kontinuierliche unkontrastierte Mittelschicht das Ergebnis ausgeprägter Proteindenaturierung ist. Die Frage nach dem Zustandekommen und der molekularen Äquivalenz der unkontrastierten Schicht scheint jedoch im vorliegenden Fall von untergeordneter Bedeutung zu sein. Ausschlaggebend ist, daß in der gleichen Zelle die Fixierung zu Membranbildern führt, deren Mittelschichten in ihrer Dicke unterschieden werden können.

Es liegt nahe, zwischen den Membranen gleichen Typs ontogenetische Zusammenhänge zu suchen, und diese bieten sich vor allem für die „dicken Membranen“ (Mittelschicht etwa 42 Å) an. Aus der Form der Golgicisternen und der gelegentlich zu beobachtenden Häufung von Apexvesikeln in Nähe der Golgicisternen ist anzunehmen, daß die ApV von den GC gebildet werden. Außerdem scheint die Korrelation sowohl der ApV wie der MV mit dem Plasmalemma, das ebenfalls zum „dicken Membrantyp“ gehört, eindeutig zu sein: Die tiefen Invaginationen des Plasmalemmas („Lomasomen“) sind wahrscheinlich das Ergebnis von Membranfusionen, die beim Ausschleusen des Inhalts der ApV in den extrazellulären Raum stattfinden. Die mögliche Inkorporierung der MV-Membranen scheint später, nachdem die MV zunächst *in toto* ausgeschleust wurden, zu erfolgen.

#### 4.3. Bildung und Funktion der Apexvesikel

Solange chemische Untersuchungen an Vesikelfractionen und einwandfreie cytotopochemische Nachweise fehlen, sind exakte Aussagen nicht möglich. Die ApV stehen wahrscheinlich *nicht* unmittelbar mit der Zellwandsynthese in Zusammenhang, wie dies bei Wurzelhaaren der Fall ist (SIEVERS 1963 a), da sie bei der Querwandbildung nicht in Erscheinung treten. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, daß sie die für Pilze so wichtigen Exoenzyme enthalten. Diese Enzyme würden dann als Sekret der Golgicisternen entstehen, zum Ort des Bedarfs, vornehmlich zum Apex, transportiert und dort ausgeschleust werden. Im Einklang mit dieser Vorstellung steht die sowohl nach GA- wie nach Pg-Fixierung eintretende *schwache* Kontrastierung des Vesikelinhaltes, wie es bei Golgi-Produkten der tierischen Zelle die Regel ist. Die relativ hohe Brechzahl des gesamten Spitzenkörpers ( $n_D > 1,5$ ) ist wahrscheinlich hauptsächlich auf die Lipidkomponente der Membranen zurückzuführen.

#### 4.4. Golgicisternen

Ein ausgesprochenes „Golgi-Feld“ scheint nicht zu existieren, es sei denn, man interpretiert die Häufung der GC in Apexnähe als Analogon. Dagegen spricht, daß die im basalen Teil der Zelle isoliert liegenden Einzelcisternen funktionell anscheinend nicht von den in der Apikalregion gehäuft auftretenden unterschieden sind.

Das Fehlen der charakteristischen Stapelbildung läßt eine Differenzierung in proximale und distale Fläche (WHALEY 1966) und damit die Festlegung einer Bildungsrichtung der im Dictyosom ablaufenden Vorgänge nicht zu. Daraus ergibt sich, daß die Dictyosombildung keine *conditio sine qua non* für die Aktivität des Zellorganells darstellt. Andererseits sind typische Dictyosomen bei verschiedenen Pilzen in bestimmten Entwicklungsphasen eindeutig nachgewiesen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß das Dictyosom bei Pilzen nur temporären Charakter trägt. Dabei besteht die vorläufig unbewiesene Möglichkeit, daß das Gesamtdictyosom quantitativ und qualitativ etwas an-

deres sein kann als nur die Summe der Aktivitäten ihrer konstituierenden Einzelzisternen.

Für eine vom Zellkern gesteuerte Aktivität oder Neubildung (WERZ 1964) der GC spricht deren Häufung in Kernnähe. Eine direkte Herkunft von der Kernhülle (WISCHNITZER 1963, MOOR *et al.* 1963) ist unwahrscheinlich, da deren Membranen dem „dünnen“ Typ angehören und Evaginationen nicht beobachtet wurden.

Das auch autoradiographisch (CARO *et al.* 1964) belegte Konzept eines direkten Zusammenhanges zwischen ER und GC kann für den vorliegenden Fall nicht eindeutig widerlegt werden. Es ist jedoch durch die zahlreichen Schnittserien sichergestellt, daß keine direkte Verbindung des ER mit fertig ausgebildeten Golgicisternen existiert.

Dem Elmi-Kollektiv unter der Leitung von Fräulein FRITSCHKE und Herrn Ing. WACHSMUTH sowie Frau BÄHRING und Frau POHL sei für ihre große Einsatzfreudigkeit bestens gedankt.

## Literatur

- BARTNICKI-GARCIA, S., NANCY NELSON, and E. COTA-ROBLES, 1968: A novel apical corpuscle in hyphae of *Mucor rouxii*. J. Bact. **95**, 2399—2402.
- BRADLEY, S. G., and DONNA RITZI, 1968: Composition and ultrastructure of *Streptomyces venezuelae*. J. Bact. **95**, 2358—2364.
- BRENNER, D. M., and GEORGE C. CARROLL, 1968: Fine-structural correlates of growth in hyphae of *Ascodesmis sphaerospora*. J. Bact. **95**, 658—671.
- BRIAN, P. W., 1949: Studies on the biological activity of Griseofulvin. Ann. Bot. **13**, 59—77.
- BRUNSWIK, H., 1924: Untersuchungen über die Geschlechts- und Kernverhältnisse bei der Hymenomycetengattung Coprinus. Geobot. Abhandl. H. 5.
- CARO, LUCIEN G., and GEORGE E. PALADE, 1964: Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. J. Cell Biol. **20**, 473—495.
- CHAPMAN, D., and D. J. FLUCK, 1966: Physical studies of phospholipids, III. Electron microscope studies of some pure fully saturated 2,3-diacyl-DL-phosphatidyl-ethanolamines and phosphatidyl-cholines. J. Cell Biol. **30**, 1—11.
- FULLER, MELVIN S., and RUDOLF REICHEL, 1965: The zoospore and early development of *Rhizidiomyces apophysatus*. Mycologia **LVII**, 946—961.
- GIRBARDT, M., 1955: Lebendbeobachtungen an *Polystictus versicolor* (L.). Flora **142**, 540—563.
- 1956: Eine Methode zum Vergleich lebender mit fixierten Strukturen bei Pilzen. Z. wiss. Mikroskopie **63**, 16—21.
- 1957: Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor* (L.). Planta **50**, 47—59.
- 1957 a: Basidiomyceten II. Das Chondriom von *Polystictus versicolor* (L.). Film THF 201.
- 1965: Die Substruktur der Spitze von *Polystictus versicolor*. Disk.-Vortrag. Symp. über Hefeprotoplasten, Jena.
- 1965 a: Eine Zielschnittmethode für Pilzzellen. Mikroskopie **20**, 254—264.
- 1969: Über Struktur und Funktion der Mikrovesikel in Pilzhyphen. In Vorbereitung.
- GROVE, S. N., and C. E. BRACKER, 1968: Protoplasmic differentiation in growing hyphal tips. Amer. J. Bot. **55**, 703.
- — and D. J. MORRÉ, 1967: Fine structure of the growth zone in hyphae tips of *Pythium ultimum*. Amer. J. Bot. **54**, 638.
- — — 1968 a: Cytomembrane differentiation in the endoplasmic reticulum—Golgi apparatus—vesicle complex. Science **161**, 171—173.

- GROVE, S. N., D. J. MORRÉ, and C. E. BRACKER, 1967 a: Dictyosomes in vegetative hyphae of *Pythium ultimum*. Proc. Indiana Acad. Sci. **76**, 210—214.
- HAVELKOVA, M., and P. MENSİK, 1966: The Golgi apparatus in the regenerating protoplasts of *Schizosaccharomyces*. Naturwissenschaften **53**, 562.
- HESSE, G., 1967: Molmassebestimmung in Inertgasatmosphäre mit den Lösungsmitteln Benzol, Dimethylsulfoxid und Dioxan. Mikrochim. Acta (Wien), 890—899.
- ITERSON, WOUTERA VAN, and W. LEENE, 1964: A cytochemical localization of reductive sites in a gram-negative bacterium. Tellurite reduction in *Proteus vulgaris*. J. Cell Biol. **20**, 377—387.
- JAFFE, LIONEL, and HELMUT ETZOLD, 1962: Orientation and locus of tropic photoreceptor molecules in spores of *Botrytis* and *Osmunda*. J. Cell Biol. **13**, 13—31.
- KAVANAU, J. LEE, 1965: Structure and function in biological membranes, 2 Bde. San Francisco-London-Amsterdam: Holden-Day Inc.
- LANGE, INGRID, 1966: Das Bewegungsverhalten der Kerne in fusionierten Zellen von *Polystictus versicolor* (L.). Flora, Abt. A, **156**, 487—497.
- LARSON, D. A., 1965: Fine-structural changes in the cytoplasm of germinating pollen. Amer. J. Bot. **52**, 139—154.
- LIESE, W., und ROSWITHA SCHMID, 1964: Über das Wachstum von Bläuepilzen durch verholzte Zellwände. Phytopathol. Z. **51**, 385—393.
- MARCHANT, R., A. PEAT, and G. H. BANBURY, 1967: The ultrastructural basis of hyphal growth. New Phytol. **66**, 623—629.
- MCCLURE, KATHARINE, D. PARK, and P. M. ROBINSON, 1968: Apical organization in the somatic hyphae of fungi. J. gen. Microbiol. **50**, 177—182.
- MOOR, HANS, 1967: Endoplasmic reticulum as the initiator of bud formation in yeast (*S. cerevisiae*). Arch. Mikrobiol. **57**, 135—146.
- and K. MÜHLETHALER, 1963: Fine structure in frozen-etched yeast cells. J. Cell Biol. **17**, 609—628.
- PEAT, A., and G. H. BANBURY, 1967: Ultrastructure, protoplasmic streaming, growth and tropisms of *Phycomyces* sporangiophores. I. General introduction. II. The ultrastructure of the growing zone. New Phytol. **66**, 475—484.
- REYNOLDS, EDWARD S., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. **17**, 208—212.
- ROBERTSON, N. F., and S. R. H. RIZVI, 1968: Some observations on the water-relations of the hyphae of *Neurospora crassa*. Ann. Bot. **32**, 279—291.
- RYTER, A., et E. KELLENBERGER, 1958: Étude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide desoxyribonucléique. Z. Naturforsch. **13 b**, 597—605.
- SCHMID, ROSWITHA, und ELISABETH BALDERMANN, 1967: Elektronenoptischer Nachweis von sauren Mucopolysacchariden bei Pilzhyphen. Naturwissenschaften **54**, 521.
- SIEVERS, ANDREAS, 1963: Über die Feinstruktur des Plasmas wachsender Wurzelhaare. Z. Naturforsch. **18 b**, 830—836.
- 1963 a: Beteiligung des Golgi-Apparates bei der Bildung der Zellwand von Wurzelhaaren. Protoplasma **56**, 188—192.
- 1965: Funktion des Golgi-Apparates in pflanzlichen und tierischen Zellen. In: „Sekretion und Exkretion“ — Organisation d. Zelle II. Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
- 1967: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur geotropischen Reaktion. II. Die polare Organisation des normal wachsenden Rhizoids von *Chara foetida*. Protoplasma **64**, 225—253.
- SJÖSTRAND, FRITIOF S., and LUCIANO BARAJAS, 1968: Effect of modifications in conformation of protein molecules on structure of mitochondrial membranes. J. Ultrastruct. Res. **25**, 121—155.

- STRUNK, CHRISTA, 1963: Über die Substruktur der Hyphenspitzen von *Polystictus versicolor*. Z. allg. Mikrobiol. 3, 265—274.
- THORNTON, R. M., 1968: The fine structure of *Phycomyces*. II. Organization of the stage I sporangiophore apex. Protoplasma 66, 269—285.
- WERZ, GÜNTHER, 1964: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Genese des Golgi-Apparates (Dictyosomen) und ihrer Kernabhängigkeit bei *Acetabularia*. Planta 63, 366—381.
- 1965: Determination and realization of morphogenesis in *Acetabularia*. Genetic Control of Differentiation. Brookhaven Symp. in Biol. Nr. 18, 185—203.
- WHALEY, W. G., 1966: Proposals concerning replication of the Golgi apparatus. In: 3. wiss. Konf. d. Ges. Dtsch. Naturforsch. u. Ärzte, 1965. Hrsg.: P. SITTE. Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
- WISCHNITZER, SAUL, 1963: Vesicle formation from the nuclear envelope in amphibian oocytes. Chromosoma (Berlin) 13, 600—608.

Anschrift des Verfassers: Prof. Dr. M. GIBBARDT, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Beutenbergstraße 11, DX-69 Jena.