
3 Beispiele für Züchtungsforschung an Zierpflanzen

Erarbeitung von Grundlagen für die Züchtung neuer Zierpflanzen am Beispiel der Mittagsblumen

Developing fundamentals for breeding of new ornamentals using the example of midday flowers

Traud Winkelmann, Philipp Braun

Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme,
Abt. Gehölz- und Vermehrungsphysiologie, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover,

E-Mail: traud.winkelmann@zier.uni-hannover.de

DOI 10.5073/jka.2017.457.009



Zusammenfassung

Für die Anwendung von Züchtungsmethoden, wie Art- und Gattungskreuzungen oder Polyploidisierung, für neue Zierpflanzen fehlen in vielen Fällen grundlegende Informationen über die jeweiligen Gattungen und Arten. Am Beispiel der Mittagsblumengewächse (Aizoaceae), die aufgrund ihrer intensiven, strahlenden Blütenfarben und ihrer Trockentoleranz Kandidaten für neue Zierpflanzen darstellen, werden Untersuchungen zur Blütenentwicklung, zur Bestimmung von DNA-Gehalten sowie zu Kreuzungskompatibilitäten vorgestellt. Für keinen der untersuchten Genotypen der Gattungen *Cephalophyllum*, *Lampranthus* und *Delosperma* wurde ein obligater photoperiodischer Einfluss auf die Blühinduktion festgestellt, jedoch waren unterschiedliche Reaktionen auf die Tagesmitteltemperatur für die Vertreter der drei Gattungen nachweisbar.

Kreuzungsversuche innerhalb und zwischen den Gattungen *Lampranthus* und *Delosperma* zeigten späte präzygotische Hybridisierungsbarrieren bei einigen interspezifischen und intergenerischen Kombinationen. Deutlich häufiger waren postzygotische Kreuzungsbarrieren, die sich in verzögerter und anormaler Entwicklung der zygotischen Embryonen und in Chlorophylldefekten sowie geringer Vitalität der Nachkommen äußerten. Die Überwindung der postzygotischen Barrieren durch In-vitro-Aussaats und Embryo Rescue-Ansätze resultierte in wenigen, durch AFLP-Marker nachgewiesenen intra- und intergenerischen Hybriden.

Pollenuntersuchungen mit dem Ziel der Identifikation von unreduzierten Gameten zeigten, dass durchflusszytometrische Analysen zu Fehlinterpretationen führen können, weil zusammenhängende Spermakerne und vollständige „male germ units“ (MGUs) zu Peaks an der 2C- bzw. 3C-Position führen. Pollenkerne waren aber gut zur Abschätzung der DNA-Gehalte nutzbar. Bei *Delosperma* Genotypen lagen diese zwischen 1,18 pg/2C und 3,68 pg/2C und bei *Lampranthus* Genotypen zwischen 1,6 pg/2C und 2,36 pg/2C.

Die Gewebe fast aller Pflanzenorgane wiesen Zellen mit mindestens fünf unterschiedlichen DNA-Gehalten (2C-32C) auf. Hohe Anteile endoreplizierter Zellen wurden in Keimblättern (74-87 %), Blütenblättern (56-95 %) und älteren, voll entfalteten Blättern (64-90 %) nachgewiesen, so dass Organe mit geringen Anteilen, wie Wurzeln (23-34 %), Internodien (29-45 %) und junge Blätter (17-56 %), für die In-vitro-Sprossregeneration und Polyploidisierungsansätze vermutlich geeigneter sind, da sich laut Literatur endoreplizierte Zellen nicht mehr teilen können.

Stichwörter: Blüteninduktion, Durchflusszytometrie, Embryo rescue, Endoreduplikation, Interspezifische Hybridisierung, Polyploidisierung, unreduzierte Gameten

Abstract

For most new ornamentals, fundamental knowledge on the respective species and genera is largely missing that is needed to establish breeding methods, including interspecific and intergeneric hybridization and polyploidization. Using the example of midday flowers (Aizoaceae) which are interesting candidates for new ornamentals due to their special and very intense flower colours and their drought tolerance, investigations on flower development, DNA contents, and crossing compatibility are presented. An obligate photoperiodic reaction was not detectable for any of the genotypes of the genera *Cephalophyllum*, *Lampranthus*, and *Delosperma*, whereas different reactions to daily mean temperatures were observed depending on the genus.

In cross pollination experiments within and among the genera *Lampranthus* and *Delosperma*, late acting pre-zygotic hybridization barriers were recorded in some interspecific and intergeneric combinations. However, post-zygotic barriers were observed more frequently, resulting in delayed and abnormal development of the zygotic embryo, chlorophyll deficiencies and low vigour of the offspring. By employing in vitro sowing and embryo rescue techniques, few interspecific and intergeneric hybrids were obtained, the hybrid status of which was confirmed by AFLP markers.

Aiming at the detection of unreduced gametes pollen grains were analysed. It turned out that flow cytometric analyses may lead to misinterpretation of the data, because pairs of sperm nuclei as well as complete male germ units (MGU) result in peaks at the 2C or 3C position, respectively. Pollen nuclei were useful for the estimation of DNA contents: In *Delosperma* and *Lampranthus*, the DNA contents ranged from 1.18 pg/2C to 3.68 pg/2C and from 1.6 pg/2C to 2.36 pg/2C, respectively.

The tissues of all analyzed plant organs consisted of cells with up to five different DNA amounts (2C-32C). High proportions of endoreduplicated cells were detected in cotyledons (74-87 %), petals (56-95 %) and older, fully expanded leaves (64-90 %), whereas organs with lower portions, such as roots (23-34 %), internodes (29-45 %) and young leaves (17-56 %) might be well-suited for in vitro shoot regeneration and polyploidization, since endoreduplicated cells are assumed to lose their ability for mitotic cell division.

Keywords: embryo rescue, endoreduplication, flow cytometry, flower induction, interspecific hybridization, polyploidization, unreduced gametes

Einleitung

Bereits für die gut untersuchten Zierpflanzen, wie Rosen oder Petunien, liegen im Vergleich zu landwirtschaftlichen Arten deutlich weniger Informationen zur Vererbung wichtiger Merkmale, zu Sequenzen oder zu Protokollen für biotechnologische Verfahren zur Unterstützung der Züchtung vor. Jedoch müssen für viele Arten und Gattungen, die ein Potential als neue Zierpflanzen haben, biologische, zytologische und genetische Grundlagen in der Regel erst geschaffen werden, bevor eine zielgerichtete Züchtung beginnen kann. Dass dabei unerwartete Schwierigkeiten auftreten, aber auch interessante Erkenntnisse gewonnen werden, die nicht aus der Arbeit an Modellpflanzen übertragen werden können, soll am Beispiel unserer Untersuchungen an Mittagsblumengewächsen (Aizoaceae) verdeutlicht werden. Mittagsblumen bestechen durch unter anderem auf den selbteren Betalain-Pigmenten beruhenden sehr intensiven, besonderen Blütenfarben (s. a. Abb. 1). Zudem kommen einige Vertreter aufgrund der Sukkulenz auch mit Trockenperioden zurecht. Beide Eigenschaften machen zum Beispiel Vertreter der drei Gattungen *Cephalophyllum*, *Lampranthus* und *Delosperma* zu interessanten Kandidaten für die Entwicklung neuer Zierpflanzen. Züchterisch interessant wäre die Kombination von günstigen Wuchseigenschaften (gute Verzweigung, kompakter Wuchs), Reichblütigkeit und leuchtende Blütenfarben, die bisher nur in Vertretern unterschiedlicher Gattungen zu finden sind. Interesse besteht daher an der Etablierung von Art- und Gattungskreuzungen. Methoden zur Polyploidisierung zur Erzielung von größeren Organen sowie Sterilität ist ein weiteres Zuchtinstrument, das Züchtungsfortschritt beschleunigen kann. Grundlegend für die Züchtung ebenso wie für die spätere gärtnerische Kultur sind Informationen zu Faktoren, die die Blüteninduktion bewirken bzw. verhindern. Zu diesen drei Themengebieten werden in den drei folgenden Kapiteln die Ergebnisse eines dreijährigen Forschungsprojekts zusammengefasst.



Abb. 1 Blüten von Vertretern der drei untersuchten Gattungen *Cephalophyllum* (A), *Delosperma* (B) und *Lampranthus* (C).

Fig. 1 Flowers of members of the investigated genera *Cephalophyllum* (A), *Delosperma* (B) and *Lampranthus* (C)

Untersuchungen zur Blüteninduktion

Die meisten Vertreter der Aizoaceae stammen aus Südafrika und haben dort ihr Hauptverbreitungsgebiet (VAN JAARVELD und DE PIENAAR, 2004), wo sie aufgrund der klimatischen Gegebenheiten sehr genau synchronisiert und nur in kurzen Zeiträumen blühen (LE ROUX et al., 1989; COWLING et al., 1999). Da die Blüte unter deutschen Gewächshausbedingungen sporadisch und nicht reproduzierbar erschien, fehlten offenbar die am Naturstandort wirksamen Schlüsselreize. Aus den Ergebnissen von Versuchen zur Kultur unter Langtag- (16 h), Kurztag- (9 h) sowie Kurztagbedingungen mit Nachtunterbrechung war abzuleiten, dass keine obligate Tageslängenreaktion für die untersuchten Genotypen der Gattungen *Cephalophyllum*, *Lampranthus* und *Delosperma* festzustellen war, da unter allen Bedingungen Blüten gebildet wurden (BRAUN und WINKELMANN, 2016a). Ein ansprechender Habitus mit voller Blütengröße wurde allerdings nur unter Langtagbedingungen erzielt. Zukünftige Untersuchungen sollten auch Lichtsumme und Lichtqualität (z. B. durch Verwendung von schmalbandigen LEDs) mit einbeziehen.

Der zweite Faktor, der aufgrund der natürlichen Habitats der untersuchten Gattungen, im Hinblick auf die Blüteninduktion in einem Klimakammerversuch geprüft wurde, war die Temperatur. Dabei zeigte sich, dass die Blütenbildung bei *Lampranthus* Genotypen durch niedrige Tagesmitteltemperaturen von 14 °C gefördert wurde, während der untersuchte Genotyp von *Delosperma* mehr Blüten bei 20 °C Tagesmitteltemperatur bildete (BRAUN und WINKELMANN, 2016a). Die Herkunft der beiden Gattungen aus Winterregen- bzw. Sommerregengebieten legt nahe, dass die Wasserverfügbarkeit ein entscheidender evolutionärer Faktor für die Entstehung dieser Reaktionsmuster war. Weitere Untersuchungen, die auch kurzzeitige Einwirkungen von niedrigen Temperaturen beinhalten, sollten folgen, um die Temperaturbedürfnisse der verschiedenen Arten und der Arthybriden zu charakterisieren. Auch Wechselwirkungen zwischen Tageslänge und Temperatur sind denkbar. Die genetischen und physiologischen Grundlagen der Blütenöffnung und -schließung im Tagesverlauf sollten ebenfalls erforscht werden.

Für die Kultursteuerung von neuen Zierpflanzen sind zahlreiche und umfangreiche Klimakammerversuche notwendig, um die blühinduzierenden Faktoren zu identifizieren. Auch wenn viele Schlüsselgene und Regulationswege aus Modellpflanzen bekannt sind (z. B. SRIKANTH und SCHMID, 2011) und einige genetische Steuerungsmechanismen konserviert zu sein scheinen, sind hier klassische pflanzenphysiologisch ausgerichtete Experimente vonnöten.

Identifizierung und Lokalisierung von Barrieren nach Selbstbestäubung bzw. interspezifischen und intergenerischen Hybridisierungen

Für wenig bearbeitete Arten muss zunächst geprüft werden, ob Selbstinkompatibilität vorliegt. Dazu wurden für die beiden im Detail untersuchten Gattungen *Delosperma* und *Lampranthus* Untersuchungen zum Pollenschlauchwachstum in situ mittels Anilinblaufärbung sowie zum Samenansatz nach Selbstbestäubung durchgeführt. Es wurde dabei gezeigt, dass bei allen untersuchten Genotypen Selbstinkompatibilität nachweisbar war, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. Während das Pollenschlauchwachstum bei *Delosperma* Genotypen bereits auf der Narbenoberfläche gehemmt wurde, lagen bei Vertretern von *Lampranthus* spät wirkende Selbstinkompatibilitätsmechanismen vor, die zu ausbleibender Befruchtung oder einem Absterben des Embryos führten (BRAUN und WINKELMANN, 2016b). Daher scheint die Kastration von Blüten vor Kreuzungen in Züchtungsprogrammen nicht notwendig zu sein. Andererseits wird die Entwicklung von Inzuchtlinien bei diesen beiden Gattungen nicht ohne besondere Behandlungen gelingen.

Art- und Gattungskreuzungen waren an der Entwicklung vieler Zierpflanzen beteiligt und sind auch für die Züchtung etablierter und neuer Zierpflanzen von großem Interesse. Häufig führen solche interspezifischen oder intergenerischen Kreuzungen nicht zu lebensfähigen Hybriden, weil sowohl prä- als auch postzygotisch Barrieren existieren, die zum Teil mit Hilfe besonderer Behandlungen oder biotechnologischer Verfahren überwunden werden können. Für *Delosperma* und *Lampranthus* wurden deshalb umfangreiche Kreuzungsexperimente durchgeführt, in denen über die Verfolgung des Pollenschlauchwachstums und die Beobachtung der frühen Embryogenese mit Hilfe der Differenzialinterferenz-Mikroskopie Erkenntnisse über die vorliegenden Barrieren gewonnen wurden. Kreuzungen zwischen verschiedenen Genotypen von *Delosperma* wurden weitgehend als kompatibel eingestuft und führten zu lebensfähigen Hybriden. Im Gegensatz dazu blieben die meisten Kreuzungen zwischen *Lampranthus* Genotypen ohne Erfolg, weil sowohl prä- als auch postzygotische Barrieren beobachtet wurden. Die Pollenschläuche erreichten die Samenanlagen deutlich seltener als in kompatiblen Kombinationen, die Befruchtung blieb teilweise aus und die Embryogenese war stark verlangsamt. Ähnliche Beobachtungen wurden für Gattungskreuzungen gemacht. Mit Hilfe der In-vitro-Aussaat und der Embryo Rescue-Technik gelang es, Hybridpflänzchen in vitro heranzuziehen, die jedoch häufig früh abstarben oder starke Chlorophylldefekte aufwiesen, die zu hellgrünen Blättern bis hin zu vollständigem Albinismus führten. Aus diesen Untersuchungen ist abzuleiten, dass in den untersuchten Mittagsblumengattungen sowohl prä- als auch postzygotische Barrieren vorliegen.

Wie bereits zuvor für andere sukkulente Pflanzen (z. B. BARNWELL et al., 1998) beschrieben war die DNA Isolierung für die Analysen mit molekularen Markern sehr schwierig. Gängige Kits resultierten nur in sehr geringen Ausbeuten, während gängige DNA Extraktionsprotokolle zu unzureichender Qualität bzw. Integrität führten. Nur mit der aufwändigen Methode nach DOYLE und DOYLE (1987) und bei Verwendung von sehr jungem Blattmaterial gelang es, DNA in ausreichender Menge und Qualität für die AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Analysen zu isolieren. Mithilfe dieser molekularen Marker wurde der Hybridstatus der wenigen erhaltenen Hybriden nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die intergenerischen Hybriden (*Delosperma* x *Lampranthus*) sowohl anhand der Markeranalysen als auch vom Phänotyp dem mütterlichen Elter ähnlicher waren, so dass die Eliminierung väterlicher Chromosomen wahrscheinlich ist. Art- und Gattungskreuzungen sind also möglich, jedoch mit relativ geringen Erfolgsraten und großen Problemen durch Chlorophylldefekte und stark verringerte Hybridvitalität, was deren Anwendung in der Züchtung stark begrenzen wird. Die Einbeziehung weiterer Genotypen wäre empfehlenswert. Die Kombination aus Fluoreszenzmikroskopie nach Anilinblaufärbung der Kallose in den Pollenschläuchen zur Verfolgung von deren Wachstum bis zu den Mikropylen mit der Differenzialkontrastmikroskopie zur Beobachtung des Pollenschlauchwachstums in den Samenanlagen, der Befruchtung und der frühen Embryogenese ist auch für grundlegende Untersuchungen an anderen neuen Zierpflanzen aussichtsreich.

Untersuchungen zur somatischen und gametischen Polyploidisierung

Polyploidisierung ist ein wichtiger evolutionärer Prozess in der Artbildung (RAMSEY und SCHEMSKE, 1998), führt generell zu vergrößerten Organen und kann zur Erstellung steriler triploider Pflanzen genutzt werden, deren Blütenhaltbarkeit oft länger ist, ebenso wie zur Wiederherstellung der Fertilität nach Artkreuzungen. Es gibt grundsätzlich zwei Wege der Polyploidisierung: die erste Möglichkeit besteht in der Aufdopplung somatischer Zellen, die in einer identischen Verdopplung der genetischen Information resultiert. Züchterisch interessant ist der zweite Weg, die Nutzung unreduzierter Gameten, die je nach Zeitpunkt der Aufdopplung in der Meiose zu Heterozygotie und allelischer Variation in den erhaltenen polyploiden Nachkommen führen kann (BRETAGNOLLE und THOMPSON, 1995, DE STORME und GEELEN, 2013). In der Pflanzenzüchtung wird somatische Polyploidisierung durch antimitotische Agenzien, wie Kolchizin, Oryzalin oder Trifluralin induziert (DHOOGHE et al., 2009). Die Bildung unreduzierter Gameten ist genetisch kontrolliert, kann aber durch extreme Temperaturen oder die Anwendung von Spindelfasergiften oder Lachgas stimuliert werden (YOUNIS et al., 2014).

Für Mittagsblumengewächse wären beide Polyploidisierungsansätze von Interesse. Zunächst wurde untersucht, ob spontan unreduzierte männliche Gameten entstehen. Dazu wurden Kerne aus in vitro gekeimten Pollen von Genotypen der beiden Gattungen *Delosperma* und *Lampranthus* durchflusszytometrisch analysiert. Zwischen 5,5 und 30,7 % der vermessenen Kerne wiesen eine Fluoreszenzintensität auf, die einem DNA-Gehalt von 2C entsprach, was auf unreduzierte Gameten hindeutete (BRAUN und WINKELMANN, 2016c). Da aber auch Kerne mit einem schwer erklärbaren DNA-Gehalt von 3C (- 6 % der analysierten Partikel) auftraten, schlossen sich detaillierte mikroskopische Untersuchungen an, die zeigten, dass die 2C- und 3C-Kerne zumindest teilweise auf zusammenhängende Spermakerne bzw. vollständige „male germ units“ (MGU, bestehend aus zwei Spermakernen und einen vegetativen Kern) zurückzuführen waren. Daher ist die Durchflusszytometrie in diesem Fall nicht geeignet zum Nachweis unreduzierter Gameten bzw. deren Häufigkeit. Da zudem keine Unregelmäßigkeiten in der Meiose nachgewiesen werden konnten, treten unreduzierte Gameten bei den untersuchten Mittagsblumengewächsen offenbar – wenn überhaupt – nur sehr selten auf und könnten über Ploidiebestimmungen in Nachkommen nachgewiesen werden. Die Pollenkerne eigneten sich gut zur Abschätzung der DNA-Gehalte, die im Vergleich zum Standard Tomate (*Solanum lycopersicum*) vorgenommen wurde. Vertreter beider Gattungen haben vergleichsweise kleine Genome: Bei *Delosperma* Genotypen lagen die DNA-Gehalte zwischen 1,18 pg/2C und 3,68 pg/2C und bei *Lampranthus* Genotypen zwischen 1,6 pg/2C und 2,36 pg/2C.

Endoreduplikation, das heißt die kontinuierliche DNA-Replikation ohne Teilung der Chromosomen bzw. ohne Zellteilung, kommt außergewöhnlich häufig in sukkulenten Pflanzenarten mit kleinen Genomen vor (DE ROCHER et al., 1990). Es wird angenommen, dass damit das Wachstum wasserspeichernder großer Zellen ermöglicht wird. Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene Organe von Vertretern der Aizoaceae durchflusszytometrisch charakterisiert (BRAUN und WINKELMANN, 2015, 2016c). Es stellte sich heraus, dass in allen untersuchten Geweben große Anteile von Zellen mit mindestens fünf unterschiedlichen DNA-Gehalten (2C-32C) auftraten (Tab. 1). Besonders hohe Anteile endoreplizierter Zellen wurden in Keimblättern (74-87 %), Blütenblättern (56-95 %) und älteren, voll entfaltenen Blättern (64-90 %) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu waren in Wurzeln (23-34 %), Internodien (29-45 %) und jungen Blätter (17-56 %) relativ geringe Anteile endoreduplizierter Zellen vorhanden. Da sich endoreplizierte Zellen vermutlich nicht mehr teilen können, erscheinen für die In-vitro-Sprossregeneration und Polyploidisierungsansätze sehr junge Blätter, Internodien und ggf. Wurzeln geeigneter. Versuche zur Regeneration und zur Behandlung mit Spindelfasergiften sind notwendig, um die vermutete bevorzugte Regeneration aus 2C Zellen, ggf. eine Deduplikation sowie die Regulation der Endoreduplikation auf tetraploider Ebene zu belegen.

Tab. 1 Anteile von Zellkernen [%] unterschiedlicher DNA-Gehalte (C-Werte) von drei *Lampranthus*-Genotypen und einem *Delosperma*-Genotyp (angegeben sind die Minima und Maxima innerhalb der Gattungen)

Tab. 1 Proportion of cell nuclei [%] with different C-levels in various tissues of three *Lampranthus* genotypes and one *Delosperma* genotype (minimal and maximal values within the genus are presented)

Gattung	C-Wert	Organ					
		Laubblatt		Internodium	Wurzel	Petale	Keimblatt
		jung	alt				
<i>Lampranthus</i>	2	31-70	6-19	41-68	67-81	3-13	11-32
	4	32-59	12-60	22-33	18-29	14-52	12-24
	8	2-11	19-58	6-19	1-4	24-40	27-50
	16	0-2	2-28	1-8	0	9-40	12-34
	>16	0-0,3	0-4	0	0	5-16	0-6
<i>Delosperma</i>	2	80-85	32-45	62-77	47-80	42-47	-
	4	14-18	42-46	18-27	19-42	31-45	-
	8	1-2	12-23	4-9	1-11	10-13	-
	16	0	1-2	1-2	0-0,3	2-13	-
	>16	0	0	0	0	0-1	-

Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass für die züchterische Arbeit mit wenig untersuchten Arten, die das Potential für neue Zierpflanzen tragen, nur begrenzt die für Modellpflanzen vorliegenden Informationen genutzt werden können. Gleichzeitig bergen diese Untersuchungsobjekte botanische, physiologische und genetische Eigenheiten, deren Aufdeckung interessante grundlegende Erkenntnisse liefern kann.

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie für die Förderung des Projekts über die AiF im Rahmen von "Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM)" [KF2508005MD2] und Frau Dr. A. Dohm sowie Herrn U. Lohmüller bei der Firma Selecta One für die gute Zusammenarbeit.

Literatur

- BARNWELL, P., BLANCHARD, A.N., BRYANT, J.A., SMIRNOFF, N. UND A.F. WEIR, 1998: Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium*. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**, 133-138.
- BRAUN, P. UND T. WINKELMANN, 2015: Cytological investigations in midday flowers (Aizoaceae) reveal high DNA contents in different somatic tissues and potential occurrence of unreduced male gametes. *Acta Horticulturae* **1087**, 437-444.
- BRAUN, P. UND T. WINKELMANN, 2016a: Effect of photoperiod and temperature on flower induction in three Aizoaceae genera. *Eur J Hort Sci* **81**(4), 204-211. <http://dx.doi.org/10.17660/eJHS.2016/81.4.3>
- BRAUN, P. UND T. WINKELMANN, 2016b: Localization and overcoming of hybridization barriers in *Delosperma* and *Lampranthus* (Aizoaceae). *Euphytica* **211**, 255-275. DOI 10.1007/s10681-016-1751-x
- BRAUN, P. UND T. WINKELMANN, 2016c: Flow cytometric analyses of somatic and pollen nuclei in midday flowers (Aizoaceae). *Caryologia* **69**, 303-314. DOI: 10.1080/00087114.2016.1188359
- BRETAGNOLLE, F. UND J.D. THOMPSON, 1995: Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol* **129**, 1-22.
- COWLING, R.M., ESLER, K.J. UND P.W. RUNDEL, 1999: Namaqualand, South Africa – an overview of a unique winter-rainfall desert ecosystem. *Plant Ecology* **142**, 3-21.
- DE ROCHER, E.J., HARKINS, K.R., GALBRAITH, D.W. UND H.J. BOHNERT, 1990: Developmentally regulated systemic endopolyploidy in succulents with small genomes. *Science* **250**, 99-101.
- DE STORME, N. UND D. GELEN, 2013: Tansley review. Sexual polyploidization in plants – cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytologist* **198**, 670-684.
- DHOOGHE, E., DENIS, S., EECKHAUT, T., REHEUL, D. UND M.C. VAN LABEKE, 2009: In vitro induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. *Euphytica* **168**, 33-40.

- DOYLE, J.J. UND J.L. DOYLE, 1987: A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-15.
- LE ROUX, A., PERRY, P. UND X. KYRIACOW, 1989: South Africa. In ORSHAN, G. (Hrsg.): *Plant phenomorphological studies in mediterranean type ecosystems*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 159-346
- RAMSEY, J. UND D.W. SCHEMSKE, 1998: Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* **29**, 467-501.
- SRIKANTH, A. UND M. SCHMID, 2011: Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2013-2037.
- VAN JAARSVELD, E.J. UND U. DE PIENAAR, 2004: *Aizoaceae – Die Mittagsblumen Südafrikas*. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- YOUNIS, A., HWANG, Y.-J. UND K.B. LIM, 2014: Exploitation of induced 2n-gametes for plant breeding. *Plant Cell Rep* **33**, 215-223.