

一過的導入による花粉の可視化とゲノム編集

水多 陽子

名古屋大学 高等研究院 トランスフォーマティブ生命分子研究所
〒464-8601 名古屋市千種区不老町

Biolistic-delivery-based pollen visualization and genome editing

Yoko Mizuta

Institute for Advanced Research, Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM),
Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

Keywords: Pollen, Fertilization, Transient expression, Fluorescent protein, Live-imaging

DOI: 10.24480/bsj-review.14a4.00239

1. はじめに

花を咲かせる植物を被子植物と呼ぶ。花は被子植物の生殖器官であり、オスのゲノムを運ぶ細胞は花粉と呼ばれ、配偶子である精細胞を含む。一方でメスのゲノムを持つ細胞は卵細胞と呼ばれ、胚珠と呼ばれる母体組織のなかに埋め込まれている。種子をつくるには精細胞と卵細胞が出会い受精する必要があるが、精細胞は自力で卵細胞へと辿り着く能力を持たない。そこで、花粉は花粉管と呼ばれる管状の細胞を伸ばし、卵細胞に配偶子を届けることで受精をおこなっている。すなわち、花粉はオスのゲノムをメスの細胞へと運ぶのに特化した植物独自の生殖細胞といえる。本稿では花粉を一過的に可視化し、花粉が発芽し花粉管を伸長させ、受精に至るまでの過程を生きたまま観察する手法について、最新の成果を交えつつ紹介する。また、一過的導入によって花粉をゲノム編集する手法についても併せて紹介する。

2. 被子植物の花粉と生殖過程

被子植物の花粉は、精細胞の分裂時期によって二細胞性花粉（二核性花粉）と三細胞性花粉（三核性花粉）の2つに分類される（図1）。二細胞性花粉では、花粉内に雄原細胞と呼ばれる精細胞の前駆細胞が内包された状態で葯から放出される。すなわち、二細胞性花粉は花粉の栄養細胞の核である栄養核と雄原細胞の核、あわせて2つの核を持つ（二核性）。その後、二細胞性花粉は受精過程において雄原細胞が分裂し、2つの精細胞を形成する。一方で三

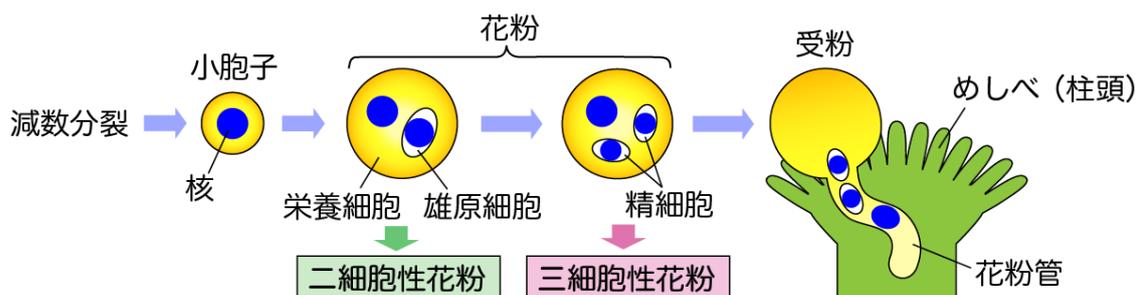


図1. 被子植物の花粉の発生

細胞性花粉では花粉がまだ葯内にある時期に雄原細胞が分裂し、2つの精細胞を形成する。すなわち、三細胞性花粉は栄養核と2つの精細胞の核、合わせて3つの核を持つ（三核性）。二細胞性花粉と三細胞性花粉は精細胞への分裂時期が異なるだけで、両者の間に本質的な違いはないと考えられている（岩波1980）。被子植物において二細胞性花粉と三細胞性花粉を同時に生産する種は稀であり、ほとんどはどちらか一方のタイプの花粉を産生する（Lora et al. 2009）。被子植物の7割程度が二細胞性花粉を持つ種であり、ナス科やユリ科、バラ科、ゴマノハグサ科などが該当する一方で、残りの3割程度は三細胞性花粉を持ち、アブラナ科やイネ科、キク科、シソ科などが該当する（図2）（Williams et al. 2014）。どちらのタイプでも、花粉の寿命は花粉内部に含まれる水分量に依存する。通常、成熟した花粉内の水分含有量が少ないほど長い寿命を持つ（Ettore et al. 2016）。水分含有量が少ない花粉は、葯から出たあと受粉するまでの時間が長い他家受粉の種に多く見られ、逆に水分含有量が多い花粉は自家受粉の種に多い。イネやコムギは三細胞性花粉を持ち、かつ水分含有量も多いことから花粉の寿命が短く、取り扱いが難しい。特にイネでは、15分程度で花粉発芽率が3分の1以下に低下してしまうなど、数分から数十分で発芽能力を失ってしまう品種も存在する（Koga et al. 1971）。このような種の花粉は取り扱いが難しく解析が制限されるため、生殖の研究を妨げる一つの要因となっている。一方で、二細胞性花粉を持つユリのように花粉の寿命が長い種では、温度や水分量を適切に保つことで数週間から数ヶ月発芽能力を保持した花粉を保存することができる（Niimi et al. 1992）。このような種は花粉の取り扱いが容易であり、花粉や生殖過程の研究に適している。また、二細胞性花粉は精細胞への分裂を終了していないため、花粉管発芽とともに花粉の成熟過程や精細胞への分裂も解析できるというメリットがある。このような背景から、私たちは花粉への一過的導入には、主に二細胞性花粉を持つ種を用いて研究をおこなっている。そのうち本稿では、栽培や花粉の採集が比較的容易で、ゲノム情報が公開されている種であるタバコ属のベンサミアナタバコ（*Nicotiana benthamiana*）とタバコ（*Nicotiana tabacum*）を用いた研究について紹介する。

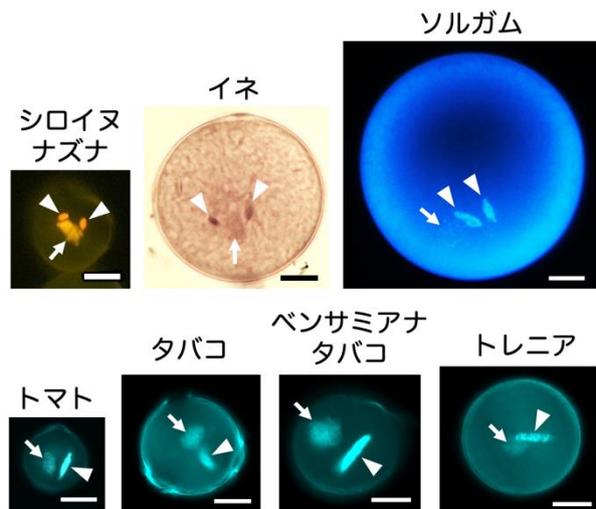


図2. 様々な被子植物の花粉

（上段）三細胞性花粉（下段）二細胞性花粉。シロイヌナズナは形質転換体、イネはヘマトキシリン染色、その他は DAPI 染色により核を可視化。矢じりは精細胞または雄原細胞の核。矢印は栄養核。スケールバーは 10 μm 。一部の写真は Nagahara et al. (2021)から改変して転載。

3. 植物細胞への遺伝子導入

蛍光顕微鏡が開発された 1900 年代初頭から、特定の組織や細胞を可視化するために様々な蛍光物質が用いられてきた。植物細胞においても形態や構造、オルガネラ、タンパク質など、目的の物体のみを生きのまま可視化する方法として蛍光色素や蛍光タンパク質が広く用いら

れている。緑色蛍光タンパク質 (GFP) が 1962 年にオワンクラゲから発見 (Shimomura et al. 1962) され、分子生物学とバイオイメージング研究は飛躍的に発展した。蛍光タンパク質を用いて目的の物体を可視化するには、蛍光タンパク質の遺伝子配列を含むプラスミド DNA を細胞内に導入し、発現させる方法が広く用いられている。ところが植物細胞は乾燥や外部の刺激から身を守るために、セルロースやヘミセルロース、ペクチン、リグニンなどの多糖類や構造タンパク質から成る非常に堅固な細胞壁を持つ (Ortiz-Matamoros et al. 2017)。そのため、プラスミド DNA を植物細胞内に導入するのは容易ではない。そのような中、これまでに植物細胞に物質を導入する様々な方法が考案されてきた。植物細胞に遺伝子を導入する方法は、生物的手法、化学的手法、物理的手法の大きく 3 つに分類される (Newell 2000)。生物的手法の一つであるアグロバクテリウム法では、土壌細菌のアグロバクテリウム (*Agrobacterium* spp.) に目的遺伝子を取り込ませ、植物細胞へ感染させることで遺伝子を細胞内に導入し、形質転換体の作出を可能とする (Zaenen et al. 1974)。この方法はモデル植物では広く用いられている方法である。しかし、アグロバクテリウムが感染できるのは一部の植物に限られ、形質転換体の作出には時間や手間のかかる組織培養の工程が必要なことも多い。また、例えば花粉や受精過程を観察する場合は、形質転換体を作成し、さらに花が咲いて観察できるようになるまで時間がかかるといった問題点もある。

このような背景から、形質転換体を作成せずに遺伝子を一過的に導入し、細胞を可視化することができる方法が検討されてきた。物理的導入法の一つであるエレクトロポレーション法や、化学的導入法の一つであるプロトプラスト-ポリエチレングリコール (PEG) 法も、一過的導入による観察に良く用いられる方法である。エレクトロポレーション法は電気パルスによって細胞膜に小さな孔をあけ、物質を導入する手法である (Neumann et al. 1982)。一方で、化学的導入方法の一つであるプロトプラスト-PEG 法は高分子化合物である PEG を細胞に作用させ、核酸などの分子を細胞内に取り込ませる手法である (Krens et al. 1982)。どちらも様々な種において高効率に細胞への導入が可能である。しかし高効率に細胞に物質を導入するには、いずれも酵素によって細胞壁を取り除いたプロトプラストと呼ばれる状態の細胞を用いる必要がある。プロトプラストは細胞壁が取り除かれているため、そのままでは個体へと発生することができない。個体を得るには細胞壁を再構築させ、再分化させるなどの組織培養の工程が必要となるが、上述したように多くの植物種では組織培養が困難であり、時間と手間も必要となる。また、花粉の場合は細胞壁が無いと発芽できないため、受精することは不可能である。すなわち、細胞壁を保持したままの植物細胞に簡便にプラスミド DNA などを導入し、その後の成長を生きのまま迅速に解析できるような方法が必要である。

以上のように、植物細胞への遺伝子導入には、植物自身の特性による導入自体の難しさや形質転換体の作出や組織培養における問題点が存在し、細胞動態の観察や植物生殖の研究が進まない原因の一つとなっている。

4. ボンバードメント法による花粉の一過的可視化と受精過程のライブイメージング

物理的な一過的導入方法の一つであるボンバードメント法は、パーティクルガン法、また

は遺伝子銃法とも呼ばれる (Klein et al. 1987)。形質転換体を作らずに植物細胞を可視化することができるため、古くから様々な植物細胞において用いられてきた (Luthra et al. 1997)。ボンバードメント法では、色素や核酸、タンパク質など導入したい分子を金粒子に付着させ、ガス圧を利用して高速で射出し細胞へ導入する (図 3A)。簡便な操作で固い細胞壁を貫通して分子を導入することができることから、花粉のみならず様々な細胞種で用いられてきた (Sanford et al. 1993)。ボンバードメント法では、表面に裸出した細胞であればプロトプラストを調整しなくとも葉や根、花粉など様々な細胞にそのまま分子を導入することができる。そこで我々は、この方法を用いて蛍光タンパク質の配列を含むプラスミド DNA を培地上でベンサムアナタバコまたはタバコの花粉に導入し、一過的発現によるライブイメージングが可能かを調査した (Nagahara et al. 2021)。導入するプラスミド DNA は細胞質で蛍光タンパク質を発現するプラスミド (*AtUBQ10p::tdTomato*, *LAT52p::mApple*, または *AtUBQ10p::sGFP*) と、核を標識するプラスミド (*AtUBQ10p::H2B-mClover3* または *35Sp::H2B-tdTomato*) をそれぞれ混合したものをを用いた。その結果、導入からわずか 2~3 時間後から蛍光タンパク質のシグナルを検出できることが明らかとなった (図 3B)。また、導入後の花粉を培地上で培養したところ花粉が発芽し、花粉管の内部を栄養核と雄原細胞が運ばれていく様子も観察された (図 3C)。同様に、プラスミド DNA を導入したタバコ花粉を除雄しためしべに受粉したところ、めしべ内部を花粉管が伸長し (図 3D 左), 胚珠へと到達する様子 (図 3D 右) が観察された。このように、細胞内を蛍光タンパク質によって一過的に可視化すれば、花粉や受精過程を生きたまま迅速に観察することが可能となる。ボンバードメント法はモデル植物だけでなく、例えば樹木など開花までに時間がかかる種や形質転換体の作出が困難な種においても、遺伝子の働きや細胞機能を調べるのに有効な方法といえる。

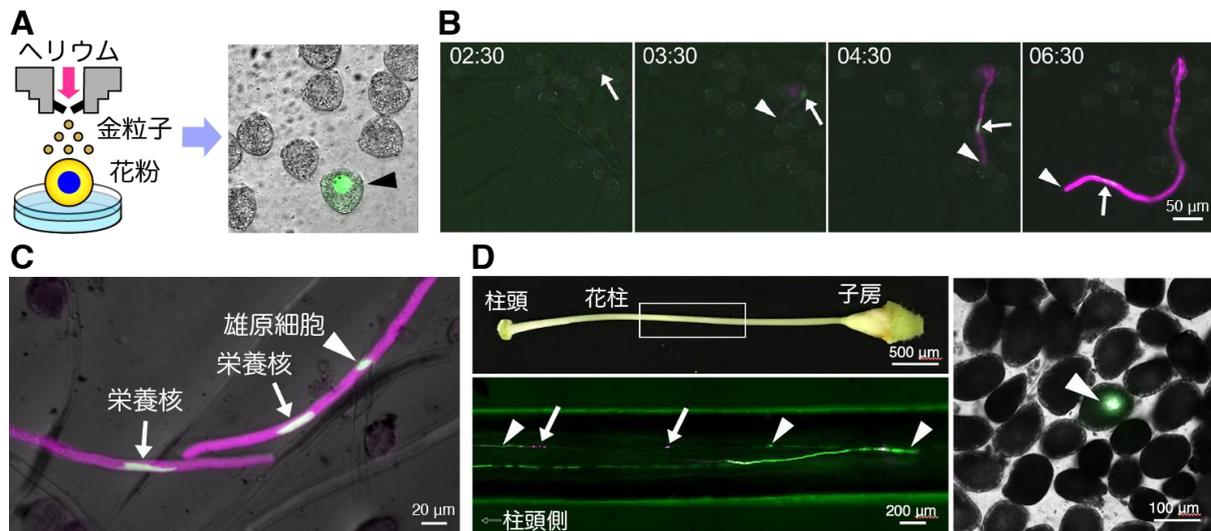


図 3. 花粉への導入と一過的発現

(A) ボンバードメントの概要と核が標識された導入花粉 (矢じり)。(B) 導入花粉からの花粉管伸長。矢印は栄養核, 矢じりは花粉管先端を示す。数字は導入からの時間 (時:分)。(C) 導入 8 時間後の花粉管。(D) 導入花粉を受粉しためしべ (左上) と花柱内部 (左下), および培地上に取り出した種子 (右)。矢じりは花粉管の細胞質の蛍光を, 矢印は核の蛍光を示す。Nagahara et al. (2021) から改変して転載。

5. 花粉での一過的発現に最適なプロモーター

遺伝子や蛍光タンパク質を目的の細胞や組織で発現させるには、適切なプロモーター配列を持つプラスミドを用いる必要がある。そこで我々は、花粉へのボンバードメントにおいて、安定的に高発現するプロモーターの探索をおこなった。検討にはベンサミアナタバコ、タバコ、トレニア (*Torenia fournieri* ‘Blue and White’), トマト (*Solanum lycopersicum* ‘Micro-Tom’) の4つの被子植物の花粉を用いた。プロモーターは、全身で発現する強制発現プロモーターとして知られているカリフラワーモザイクウイルス由来の *35S* プロモーター (*35Sp*), シロイヌナズナのリボソームタンパク質プロモーター (*AtRPS5A*), およびシロイヌナズナのユビキチンプロモーター (*AtUBQ10p*) の3つを検討した (図4)。これらのプロモーター下で、花粉の細胞質または核で蛍光タンパク質を発現するプラスミドを構築し、それぞれ花粉に導入した。その後、導入花粉から発芽・伸長した花粉管の蛍光のシグナル強度を指標にプロモーター活性を評価した。その結果、*AtUBQ10p* を用いた場合は4種全ての花粉の栄養細胞の細胞質と核、および雄原細胞の核にシグナルが観察された (図4)。一方で *35Sp* を用いた場合は、トレニアとトマトでは雄原細胞の核にシグナルが観察されたが、花粉の栄養細胞の核と細胞質ではシグナルが観察されなかった。また、*AtRPS5A* を用いた場合はベンサミアナタバコとタバコでは花粉の栄養細胞の細胞質にシグナルが検出されなかった。これらの結果から、*AtUBQ10p* は広く複数の植物種において最も安定的に花粉で高発現させることが可能なプロモーターであることが明らかとなった (Nagahara et al. 2021)。葉や根などでの強制発現には *35Sp* を用いることが多いが、形質転換体の場合、*35Sp* はタバコ花粉では発現するのに対し、シロイヌナズナ花粉では発現しない (Wilkinson et al. 1997)。これらの結果は、花粉における *35Sp* の活性は種によって異なり、一口に全身で発現する強制発現プロモーターと言っても組織や種によってその発現は異なることを示している。一方で *AtUBQ10p* には、様々な種の花での発現を可能にする恒常的なプロモーター活性を持つ配列が含まれているのかもしれない。

		<i>35Sp</i>	<i>RPS5Ap</i>	<i>UBQ10p</i>
栄養細胞 (細胞質)	ベンサミアナタバコ	+	-	+
	タバコ	+	-	+
	トレニア	-	+	+
	トマト	-	+	+
	ベンサミアナタバコ	+	+	+
栄養細胞 (核)	タバコ	+	+	+
	トレニア	-	+	+
	トマト	-	+	+
雄原細胞 (核)	ベンサミアナタバコ	+	+	+
	タバコ	+	+	+

図4. ボンバードメントに適した強制発現プロモーターの探索

蛍光タンパク質のシグナルの有無をプラスとマイナスで示す。

6. 花粉での一過的発現に最適な蛍光タンパク質

バイオイメーjingの分野では、この数十年で実に多くの種類の蛍光タンパク質が報告されており、目的や用途に応じて適した色 (波長) や種類を選択することが可能となっている (Miyawaki et al. 2015)。植物においても蛍光タンパク質の選択は重要であり、波長以外にも安定性、蛍光強度、自家蛍光との兼ね合いなどの様々な要素を考慮する必要がある。また、葉緑体を含む葉などの組織の場合、葉緑体に含まれるクロロフィルが赤色の強い自家蛍光を

発するため、波長によっては赤色蛍光タンパク質を観察するのは困難である (Mizuta et al. 2015)。一方で、多くの花粉は葉緑体を持たないため、赤色蛍光タンパク質の観察はより簡単である。しかし、種によっては細胞壁成分や細胞質の構成要素が自家蛍光を示すことがある (Mitsumoto et al. 2009)。例えば同じ花粉でもシロイヌナズナは黄緑色の自家蛍光を発し (Mizuta et al. 2015)、ベンサミアナタバコは青色の自家蛍光を発する (Kaneshiro et al. 2022)。よって、それぞれの自家蛍光を考慮しつつ蛍光タンパク質を選択することが重要となる。

ボンバードメントによる一過的発現では、tdTomato や mClover3 などの蛍光タンパク質を用いた場合、最短で導入 2~3 時間後から蛍光タンパク質のシグナルが検出可能であることを上記に述べた。このような一過的発現においては、自家蛍光以外にも蛍光タンパク質の蛍光強度や、蛍光タンパク質自身の成熟が問題となってくる。蛍光強度が高いほどバックグラウンド光の影響が小さくなり、一過的導入からシグナル検出までの時間が短くなるため、より迅速な観察が可能となる。また、蛍光タンパク質は種類によって成熟にかかる時間が異なることが知られている。大腸菌内での発現ではあるが、同じ緑色蛍光タンパク質でも wtGFP と mNeonGreen では、mNeonGreen の方が約 1/3 以下の時間で蛍光タンパク質が成熟する (Balleza et al. 2018)。例えば花粉の発芽など、導入後できるだけ早くに細胞動態や細胞内を可視化したい場合には蛍光タンパク質の蛍光強度ができるだけ高く、早く成熟するような蛍光タンパク質を選択するのが望ましい。他にも観察が長時間にわたる場合や、例えば酸性オルガネラなど特定の細胞や器官を観察する場合は、蛍光タンパク質の光安定性や pH 安定性なども重要な要素となってくる (Lambert 2019)。このように、効果的なイメージングには植物の細胞や遺伝子自体の性質に加え、目的にあわせて蛍光タンパク質の特徴も考慮し検討することが必要である。

上記のような検討をもとに、花粉に一過的にプラスミドを導入した蛍光像を紹介する。図 5 左はベンサミアナタバコの花粉に、核を緑色に標識するプラスミド (*AtUBQ10p::H2B-mClover3*) を導入し、共焦点顕微鏡で観察した像である。栄養細胞の核と雄原細胞の核が緑色で標識されていることがわかる。また、図 5 右はシロイヌナズナの液胞膜に局在する *VAM3* を緑色で標識するプラスミド (*35Sp::sGFP-AtVAM3*; Uemura et al. 2004) とセントロメア特異的なヒストン H3 である

HTR12 を赤色蛍光タンパク質で標識するプラスミド (*35Sp::tdTomato-HTR12*; Kurihara et al. 2008) を混合し導入した花粉である。動原体と核質に赤色のシグナルが観察され、花粉の細胞質内に存在する液胞の複雑な構造も観察することができる。これらの導入花粉が発芽し、花粉管が伸長すれば、精細胞への分裂や花粉管伸長時の液胞動態も生きたまま観察すること

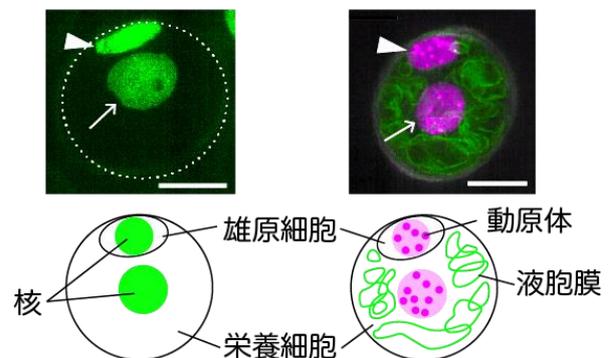


図 5. ベンサミアナタバコ花粉への一過的導入と可視化

左は核が緑色蛍光で標識されている。右は核質と動原体が赤色で、液胞膜が緑色で標識されている。矢じりは雄原細胞の核、矢印は栄養細胞の核を示す。

ができる。以上のように、細胞や蛍光タンパク質の特徴を良く理解し、一過的発現とうまく組み合わせれば、迅速なバイオイメージングも可能となるのである。

7. 一過的導入による花粉のゲノム編集

筆者らは一過的導入による可視化だけでなく、ボンバードメント法で花粉に CRISPR-Cas9 の配列を含むプラスミド DNA を導入し、花粉をゲノム編集する取り組みも進めてきた。上述のように、プラスミド DNA を導入した花粉は培地上だけでなく、めしべの上でも花粉管を伸長させることができる (Nagahara et al. 2021)。花粉への一過的導入後、花粉管がゲノム編集された精細胞または CRISPR-Cas9 などを胚珠へと送達すれば、組織培養などの過程を経ることなくゲノム編集個体を作成することが可能となる。我々はボンバードメントによる花粉のゲノム編集を調査するため、*AtUBQ10* プロモーター下で Cas9 を発現するプラスミドをベンサミアナタバコの花粉に導入し、翌日、花粉管を採取しゲノム編集の有無を調査した (図 6)。その結果、標的配列である *NbPDS3* 遺伝子上に変異を持つ花粉が複数検出された。これにより、ボンバードメント法を用いて花粉のゲノム編集が可能であることが示唆された (Nagahara et al. 2021)。

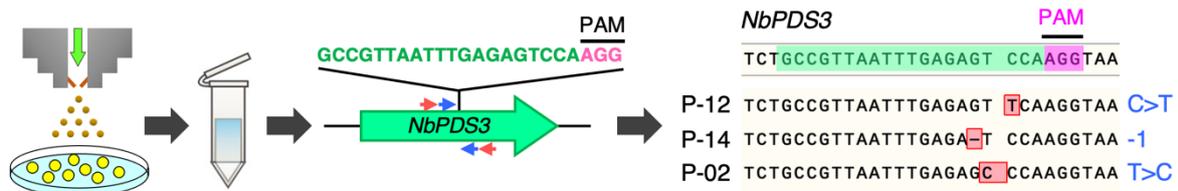


図 6. ベンサミアナタバコ花粉への一過的導入によるゲノム編集

一方で、ボンバードメント法にも細胞への導入効率が低いという短所が存在する。ベンサミアナタバコの花粉を用いた場合、花粉への導入効率は 1~2%程度であり、残りの 98~99% の花粉は何も導入されていない非導入花粉である。導入後の花粉集団から発芽し、伸長した花粉管のほとんどは非導入花粉由来となるため、培地上での花粉管の観察や、めしべ内で伸長する花粉管の観察など生殖過程の解析の際に妨げとなる。そこで、我々はボンバードメント後の花粉集団内から導入花粉を半自動的に識別し、近赤外レーザーを用いて導入花粉を選抜する方法を報告した (Kaneshiro et al. 2022)。この方法を用いることで、遺伝子が導入されていない花粉を排除し、導入花粉を 3 倍以上に濃縮した細胞集団を調整することが可能となった。

このように、一過的導入と複数のアプリケーションの組み合わせは従来の観察だけでなく、種子作出や生殖過程の解析などさらに新しい研究へと繋がる可能性を秘めている。

8. おわりに

本稿では植物細胞への一過的な導入方法を用いた花粉や生殖過程の観察、および花粉のゲノム編集について紹介した。ボンバードメント法による花粉への一過的導入は、単なる細胞内の観察にとどまらずその後の花粉管動態の解析、そして受精と種子作出の研究へと発展しつつある。これらの方法はモデル植物だけでなく、形質転換体の作出が困難な植物にも適応

可能である。今後は植物生殖分野を含む植物研究を促進する上で、有用な手法となることが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり東山哲也教授には多大なるご助言を頂いた。液胞膜を可視化するプラスミドは基生研の海老根一生博士，核を標識するプラスミドは東北大の植田美那子博士と名古屋大の栗原大輔博士，ソルガムの花粉は名古屋大の佐塚隆志博士に分与いただいた。本稿で紹介した研究は科研費（20H05778, 20H05779, 22K19328），JST A-STEP（JPMJTR194H），およびJST さきがけ（JPMJPR15QC）の研究助成による支援を受けておこなったものである。この場を借りて感謝申し上げる。

引用文献

- Balleza E, Kim JM, Cluzel P (2018) Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nat methods* 15: 47-51. doi: 10.1038/nmeth.4509
- Ettore P, Rudy D (2016) The trials and tribulations of the plant male gametophyte — understanding reproductive stage stress tolerance. In: Shanker A, Shanker C (eds.) *Abiotic and Biotic Stress in Plants — Recent Advances and Future Perspectives*. IntechOpen, London.
- 岩波洋造 (1980) 花粉学. 講談社, 東京.
- Kaneshiro I, Igarashi M, Higashiyama T, Mizuta Y (2022) Target pollen isolation using automated infrared laser-mediated cell disruption. *Quant Plant Biol* 3: e30. doi: 10.1017/qpb.2022.24
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70. doi: 10.1038/327070a0
- Koga Y, Akihama T, Fujimaki H, Yokoo M (1971) Studies on the longevity of pollen grains of rice, *Oriza sativa* L. *Cytlogia* 36: 104-110. doi: 10.1508/cytologia.36.104
- Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA (1982) In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296: 72-74. doi: 10.1038/296072a0
- Kurihara D, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K (2008) Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol* 49: 1256–1261. doi: 10.1093/pcp/pcn098.
- Lambert TJ (2019) FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nat methods* 16: 277-278. doi: 10.1038/s41592-019-0352-8.
- Lora J, Herrero M, Hormaza JI (2009) The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (Annonaceae): Implications for pollen evolution. *Am J Bot* 96: 802-808. doi: 10.3732/ajb.0800167.
- Luthra R, Varsha, Dubey RK, Srivastava AK, Kumar S (1997) Microprojectile mediated plant transformation: A bibliographic search. *Euphytica* 95: 269-295. doi: 10.1023/A:1002957229911.
- Mitsumoto K, Yabusaki K, Aoyagi H (2009) Classification of pollen species using autofluorescence image analysis. *J Biosci Bioeng* 107: 90-94. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.10.001.
- Miyawaki A, Niino Y (2015) Molecular spies for bioimaging—fluorescent protein-based probes. *Mol Cell* 58: 632-643. doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.002.

- Mizuta Y, Kurihara D, Higashiyama T (2015) Two-photon imaging with longer wavelength excitation in intact *Arabidopsis* tissues. *Protoplasma* 252: 1231-1240. doi: 10.1007/s00709-014-0754-5.
- Nagahara S, Higashiyama T, Mizuta Y (2021) Detection of a biolistic delivery of fluorescent markers and CRISPR/Cas9 to the pollen tube. *Plant Reprod* 34: 191-205. doi: 10.1007/s00497-021-00418-z.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1: 841-845. doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x.
- Newell CA (2000) Plant transformation technology. *Mol Biotechnol* 16: 53-65. doi: 10.1385/mb:16:1:53.
- Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA (1982). *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296: 72-74. doi: 10.1038/296072a0
- Niimi Y, Shiokawa Y (1992) A study on the storage of *Lilium* pollen. *J Japan Soc Hort Sci* 61: 399-403. doi: 10.2503/jjshs.61.399.
- Ortiz-Matamoros MF, Villanueva MA, Islas-Flores T (2017) Genetic transformation of cell-walled plant and algae cells: delivering DNA through the cell wall. *Brief Funct Genom* 17: 26-33. doi: 10.1093/bfpg/elx014.
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol* 217: 483-509. doi: 10.1016/0076-6879(93)17086-k.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239. doi: 10.1002/jcp.1030590302.
- Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH (2004) Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* 29: 49-65. doi: 10.1247/csf.29.49.
- Wilkinson JE, Twell D, Lindsey K (1997) Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *J Exp Bot* 48: 265-275. doi: 10.1093/jxb/48.2.265.
- Williams JH, Taylor ML, O'Meara BC (2014) Repeated evolution of tricellular (and bicellular) pollen. *Am J Bot* 101: 559-571. doi: 10.3732/ajb.1300423.
- Zaenen I, Van Larebeke N, Van Montagu M, Schell J (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol* 86: 109-127. doi: 10.1016/s0022-2836(74)80011-2.