

## **Crucial Role of Fructan in the Maintenance of Membranes of Wheat Seedlings During Severe Drought Stress**

**Farnoosh Nemati<sup>ΔV</sup>**

### **Abstract**

The plasma membrane is thought to be the major target for drought stress damage due to changes in composition and structures of water and phospholipids. Removal of water from the membrane disrupts the normal bilayer structure and results in the membrane becoming exceptionally porous when desiccated. Fructan has the capacity to stabilize membranes and prevent leakage during water cessation. In the present study the relationship between fructan content and membrane damages was evaluated in 4-day old seedlings of a drought-tolerant (Sirvan) and a drought-sensitive (Marvdasht) wheat cultivar exposed to 7 days' water cessation and subsequent re-watering. In comparison with sensitive cultivar, the tolerant one accumulated more fructan ( $3.56 \pm 0.3$  mg/g FW) meanwhile decreased the level of membrane leakage and lipid peroxidation. Freeze–thawing experiment showed that drought stress remarkably increased freeze-disrupt coefficient of sensitive cultivar (4.5 fold higher than of tolerant one) and severely damaged the epidermal and outer cortex cells of their leaves. The results suggest fructan as a flexible soluble carbohydrate with a direct protective effect on membrane integrity which plays a crucial role in the tolerance of wheat seedling against drought stress conditions.

**Keywords:** Drought, Fructan, Re-watering, Wheat.

---

<sup>ΔV</sup>. Assistant professor, Department of Biology Science, University of Ale Taha, Tehran, Iran. farnoosh.nemati@modares.ac.ir



## نقش فروکتان‌ها در حفظ غشاهای دانه‌رست‌های گندم طی تنش خشکی شدید

فرنوش نعمتی<sup>۵۸</sup>

### چکیده

در تنش خشکی، غشای پلاسمایی به دلیل تغییر در ساختار آب و فسفولیپیدها و ترکیبات آن هدف اصلی آسیب سلولی است. حذف آب از غشا، ساختار طبیعی دو لایه آن را تخریب می‌کند و سبب متخلخل شدن آن هنگام خشکی می‌شود. فروکتان توانایی پایدار کردن غشاها را دارد و از نشت غشا طی دوره از دست دادن آب جلوگیری می‌کند. در این تحقیق، ارتباط میان محتوای فروکتان و آسیب‌های غشا در دانه‌رست‌های ۴ روزه گندم در دو رقم متحمل (سیروان) و حساس (مرودشت) به خشکی طی تیمار ۷ روزه خشکی و آبیاری مجدد پس از آن، مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه با رقم حساس، رقم متحمل، میزان فروکتان بیشتری ( $0.33 \pm 0.56$  میلی‌گرم/وزن تر) داشت. درعین حال میزان نشت غشا و پراکسیداسیون لیپیدی آن کاهش یافت. آزمایش انجماد و گرم شدن برگ نشان داد که تنش خشکی به طور معنی‌دار سبب افزایش ضریب شکست فریز (FDC) در رقم حساس (۴,۵ برابر رقم متحمل) و آسیب شدید اپیدرم و سلول‌های بیرونی پوست شده است. نتایج نشان داد که فروکتان، کربوهیدرات محلول قابل انعطاف با اثر حفاظتی مستقیم بر تمامیت غشا است که در دانه‌رست‌های گندم، نقش ضروری در تحمل خشکی شدید دارد.

**واژه‌های کلیدی:** آبیاری مجدد، خشکی، فروکتان، گندم.

---

۵۸. استادیار دانشگاه، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آل طه، تهران، ایران.

farnoosh.nemati@modares.ac.ir

## مقدمه

خشکی، بزرگ‌ترین عامل تنش غیرزیستی برای گیاه است و بر تولید محصولات زراعی و بویژه غلات به عنوان پایه اصلی تغذیه و بقای بشر اثر منفی دارد. تنش خشکی تغییراتی را در مورفولوژی اساسی، فیزیولوژی و جنبه‌های بیوشیمیایی در گیاه ایجاد می‌کند [۷]. این شرایط سبب تغییر شکل اجزای دیواره سلولی، غشای پلاسمایی و غشاهای درون سلولی و محدودیت عملکرد اندامک‌ها و تمامیت سلول می‌شود. بنابراین حفظ تمامیت و پایداری غشاهای زیستی در شرایط تنش آبی جزء اصلی تحمل به خشکی در گیاهان است [۱].

فروکتان‌ها اولیگو و پلی ساکاریدهای خطی و منشعب مشتق شده از فروکتوز هستند. این کربوهیدرات غیرساختمانی علاوه بر عملکرد ذخیره‌ای، نقش‌های فیزیولوژیکی بسیاری دارد [۲]. این ترکیبات با برهم‌کنش با سرفسفولیپیدهای غشایی، سبب حفاظت سلول و ارگانسیم در شرایط تنش می‌شوند. برخی گزارش‌ها، نقش ساختار فروکتان و ژن‌های مرتبط با سنتز آن را در پاسخ تحمل به تنش تأیید کرده است [۱۲، ۸، ۱۶]. در شرایط تنش، انتقال فروکتان از واکوئل (محل سنتز) به آپوپلاست از طریق وزیکول‌های تونوپلاستی در استحکام غشا و حفاظت و زنده‌مانی سلول نقش دارد [۱۷] مطالعات نشان می‌دهد در گیاهان متحمل در شرایط تنش خشکی، فروکتان بیشتری نسبت به انواع حساس تجمع می‌یابد [۱۱].

در گندم نان (*Triticum aestivum* L)، فروکتان‌ها اصلی‌ترین منبع کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای در برگ‌ها، ساقه‌ها، لپه جوان و اندام‌های زایشی است و همراه با نشاسته یا منحصراً در واکوئل تجمع می‌یابند. از سوی دیگر مناطق زیر کشت گندم انواع مختلفی از تنش خشکی را در طول فصل رشد تجربه می‌کنند اما میزان حساسیت ارقام آن به خشکی متفاوت بوده و این حساسیت به شدت تنش و مرحله رشد بستگی دارد. گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که با وجود حساسیت مرحله جوانه‌زنی بذر و رشد دانه‌رست به کمبود آب، دانه‌رست‌های ۴ روزه ارقام متحمل و حساس گندم بهاره دارای تحمل نسبی به تنش قطع آبیاری هستند [۱۰ و ۳]. در این بررسی نقش فروکتان در

حفظ پایداری غشا و تحمل خشکی در دانه‌رست‌های ۴ روزه گندم در دو رقم حساس (مرودشت) و متحمل (سیروان)، طی تنش خشکی و آبیاری مجدد پس از آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

بذر رقم‌های مرودشت (ایرانی، حساس به خشکی آخر فصل) و سیروان (ایرانی، متحمل به خشکی آخر فصل) گندم (*Triticum aestivum* L.) از مؤسسه اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شد [۱۳ و ۱۴].

بذرها ابتدا با شوینده‌های معمولی شست‌وشو شده و پس از آبکشی با قرارگیری در الکل ۷۰ درصد (یک دقیقه) و محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد (۱۵ دقیقه) به طور سطحی ضد عفونی شدند. بذرها پس از سه بار آبکشی، با فواصل یکسان بر روی کاغذ صافی استریل در داخل ظروف یکبار مصرف، به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از این دوره، تحت نور ۳۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه در اتاق روشن با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و روشنایی ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. دانه‌رست‌های ۴ روزه (بر مبنای کدهای زادوکس [۲۱]) با اندازه برابر انتخاب شدند. در قالب یک طرح کاملاً تصادفی دانه‌رست‌ها با ۳ تکرار و ۱۰ نمونه در هر تکرار به مدت ۷ روز تحت تنش خشکی با قطع کامل آبیاری در اتاق روشن تحت شرایط ذکر شده قرار گرفته و برداشت شدند. مابقی دانه‌رست‌ها پس از آبیاری مجدد به مدت ۷ روز برداشت شدند.

### سنجش میزان فروکتان

استخراج و سنجش بر اساس روش مورد استفاده در مطالعات قبل انجام شد [۱۸]. به اختصار، نمونه‌های خشک منجمد (۰/۰۵ گرم) پس از ساییدن با نیتروژن مایع در ۱ mL اتانول ۸۰ درصد در دمای ۹۰°C قرار گرفتند. پس از تبخیر کامل اتانول، ۱ mL آب مقطر حاوی رامنوز (۰/۲۵ mg/mL) به عنوان استاندارد داخلی اضافه شد. استخراج آبی نمونه‌ها در حمام آب گرم در دمای ۸۰°C به مدت ۱ ساعت انجام شد. پس از سرد

شدن، نمونه‌ها در  $g \times 9000$  به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. به  $50 \mu L$  از استخراج آبی فوق آب دیونیزه اضافه و به حجم  $1 mL$  رسانده شد. برای اندازه‌گیری محتوای فروکتان کل، هیدرولیز اسیدی  $50 \mu L$  استخراج آبی با افزودن  $2/5 \mu L$  کلریدریک اسید  $1/2 M$  انجام شد. نمونه‌ها در دمای  $70^\circ C$  به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس به منظور توقف واکنش هیدرولیز،  $2 \mu L$  محلول سدیم کربنات  $1 M$  به نمونه‌ها اضافه و حجم آن با آب دیونیزه به  $1 mL$  رسانده شد. پس از فیلتراسیون محلول با فیلتر سر سرنگی نوع  $0.22 \mu m$ ، محتوای گلوکز، فروکتوز سوکروز و ملبیوز در نمونه‌های هیدرولیزی با دستگاه HPAEC-PAD تعیین شد. در انتها محتوای فروکتان با فرمول‌های مربوطه سنجش شد.

#### سنجش پایداری غشا

سطح آسیب‌پذیری با اندازه‌گیری نشت الکتروولیت (EI) از میان غشاها و اندازه‌گیری مالونیل دی‌آلدئید (MDA) به عنوان فراورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی با ضریب ثابت  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  و نیز کسر محتوای سوکروز (تفاضل جذب در ۴۴۰ و ۶۰۰) اندازه‌گیری شد [۵ و ۶].

تغییرات مکانیکی در برگ‌ها با استفاده از روش مطالعات قبل انجام شد [۶]. برش‌های عرضی برگ با یک قطره آب دیونیزه مابین لام و لامل قرار گرفت و اطراف آن با چسب بافت (Sakura, Japan) Tissue - Tek O.C.T<sup>TM</sup> کاملاً پوشانده شد. لامل به مدت یک شب در دمای  $20^\circ C$  - منجمد شد. سپس بلافاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $30^\circ C$  گرم شدند. از برش‌ها قبل و بعد از آزمایش (انجماد و گرم شدن) با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال (Canon EOS-Kiss X4) تصویربرداری شد. سپس محدوده انقباض (Shrinkage area) با نرم‌افزار Image J (National Institutes of Health, USA, Ver. 1.4.3.67) بررسی شد. همچنین ضریب شکست فریز (freeze-disrupt coefficient) مطابق فرمول زیر اندازه‌گیری شد که در آن SAT،  $SA_t$  و  $SA_c$  به ترتیب محدوده برش بعد تیمار انجماد و گرما، محدوده برش قبل تیمار انجماد و گرما، ناحیه انقباض نمونه در تیمار آبی و ناحیه انقباض در نمونه شاهد می‌باشد.

$$(SA) = SAT - SBT$$

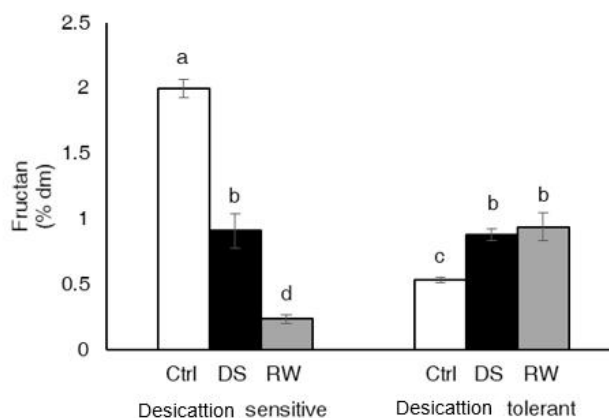
$$(FDC) = SA_t / SA_c$$

### آنالیزهای آماری

کلیه آنالیزهای فوق با سه تکرار مستقل و هریک حداقل با ۹ نمونه انجام شد. آنالیزهای آماری و آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با نرم‌افزار SPSS (version 16, Chicago, IL, USA) انجام شد. همچنین معنی‌دار بودن داده‌ها با آزمون LSD و در سطح  $P = 0.05$  بررسی شد. آزمون همبستگی داده‌ها نیز با استفاده از بستر نرم‌افزاری (<http://www.metaboanalyst.ca>) انجام گرفت.

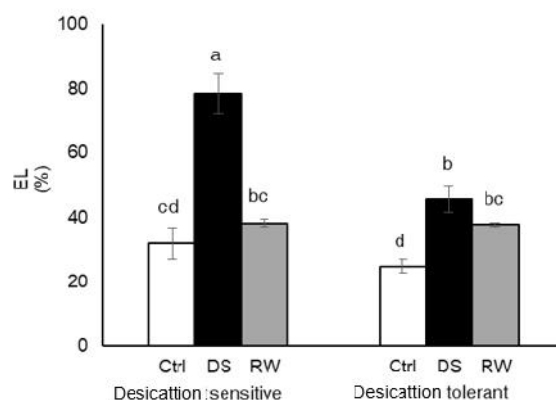
### نتایج

محتوای فروکتان کل برگ رقم حساس در شرایط کنترل، بسیار بالاتر از رقم متحمل بود ولی پس از تنش قطع آبیاری و احیای مجدد کاهش یافت (شکل ۱). در رقم متحمل، محتوای فروکتان پس از قطع آبیاری به طور معنی‌دار افزایش نشان داد که با آبیاری مجدد نیز تغییری نداشت (شکل ۱).



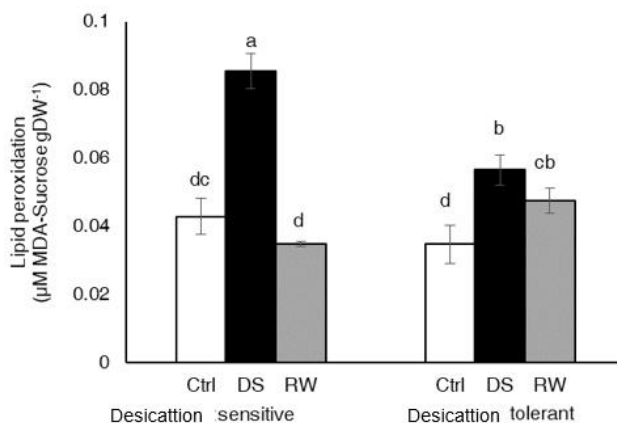
شکل ۱. محتوای فروکتان کل در دانه‌رست ۴ روزه ارقام حساس (مرودشت) و متحمل (سیروان) به قطع آبیاری گندم قبل از تیمار (Ctrl)، پس از ۷ روز تیمار قطع آبیاری (DS) و پس از ۷ روز آبیاری مجدد (RW). مقادیر، میانگین حداقل سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در حد  $p = 0.05$  بر اساس آزمون LSD است.

نشت الکترولیت‌ها از غشا در هر دو رقم حساس و متحمل به قطع آبیاری در شرایط کنترل یکسان بود (شکل ۲). در مقایسه با شرایط کنترل، طی تنش قطع آبیاری EL در هر دو رقم حساس و متحمل به طور معنی‌دار افزایش یافت که روند این تغییر در رقم حساس مشهودتر بود (شکل ۲). با آبیاری مجدد نشت الکترولیتی غشا در رقم حساس تا سطح شرایط کنترل کاهش یافت اما در رقم متحمل تغییر معنی‌دار نشان نداد (شکل ۲).



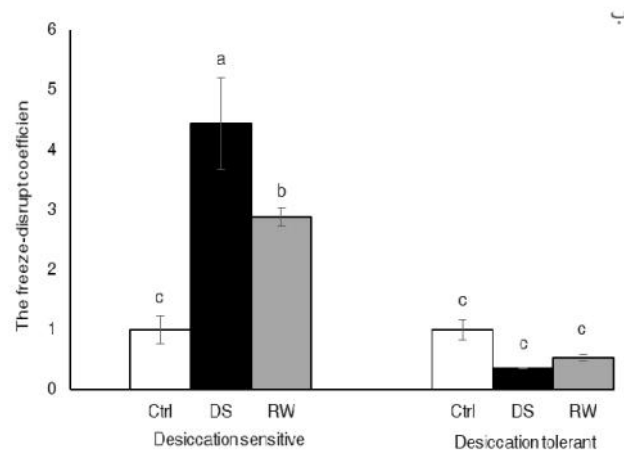
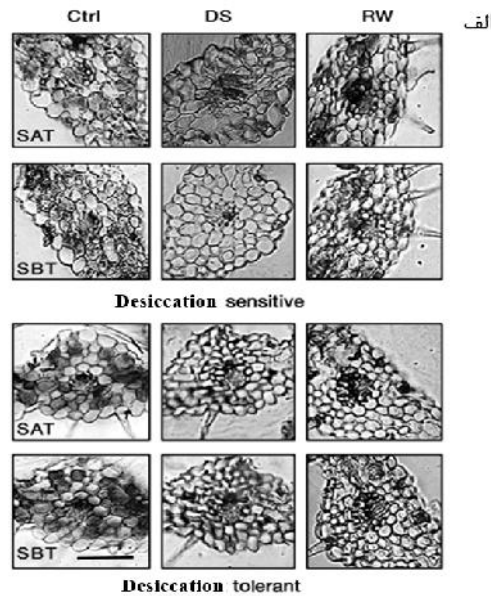
شکل ۲. نشت الکترولیت‌ها از غشا (EL) در دانه‌رست ۴ روزه ارقام حساس (مروودشت) و متحمل (سیروان) به قطع آبیاری گندم قبل از تیمار (Ctrl)، پس از ۷ روز تیمار قطع آبیاری (DS) و پس از ۷ روز آبیاری مجدد (RW). مقادیر، میانگین حداقل سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در حد  $p < 0.05$  بر اساس آزمون LSD است.

محتوای MDA به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا، در هر دو رقم حساس و متحمل در شرایط کنترل یکسان بود (شکل ۳). در مقایسه با شرایط کنترل، تنش قطع آبیاری سبب افزایش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدی غشا شد که روند افزایشی آن در رقم حساس مشهودتر بود (شکل ۳). همچنین پس از آبیاری مجدد MDA در رقم حساس تا سطح نمونه کنترل کاهش یافت اما در رقم متحمل تغییر نشان نداد (شکل ۳).



شکل ۳. پراکسیداسیون لیپیدی غشا در دانه‌رست ۴ روزه ارقام حساس (مرودشت) و متحمل (سیروان) به قطع آبیاری گندم قبل از تیمار (Ctrl)، پس از ۷ روز تیمار قطع آبیاری (DS) و پس از ۷ روز آبیاری مجدد (RW). مقادیر، میانگین حداقل سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در حد  $p < 0.05$  بر اساس آزمون LSD است.

بررسی تغییرات محدوده انقباض (SA) و نیز اندازه‌گیری کمی ضریب شکست فریز (FDC) طی آزمون انجماد و گرم شدن تغییر چندانی در برش‌های عرضی برگ دانه‌رست ۴ روزه رقم متحمل گندم نشان نداد (شکل ۴ الف). در حالی که در رقم حساس تنش قطع آبیاری سبب انقباض و تخریب لایه اپیدرمی و مزوفیل خارجی برگ شده است (شکل ۴ الف). همچنین در مقایسه با شرایط کنترل شدت FDC در رقم حساس افزایش ۴/۵ برابری را نشان داد (شکل ۴ ب).



شکل ۴. تغییرات مکانیکی غشا طی انجماد و گرم شدن. تغییرات محدوده انقباض (SA) (الف) و اندازه گیری کمی ضریب شکست فریز غشا (FDC) (ب) در دانه رست ۴ روزه ارقام حساس (مرودشت) و متحمل (سیروان) به قطع آبیاری گندم قبل از تیمار (Ctrl)، پس از ۷ روز تیمار قطع آبیاری (DS) و پس از ۷ روز آبیاری مجدد (RW). مقادیر، میانگین حداقل سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین میانگین ها در حد  $p < 0.05$  بر اساس آزمون LSD است. Scale bar = 50  $\mu$ m.

## بحث

ارتباط میان فروکتان و تحمل به تنش‌های غیرزیستی بسیار پیچیده است. این مسئله احتمالاً با تفاوت‌های ساختاری، ابعاد مولکولی و جایگاه قرارگیری این ترکیبات در بافت مرتبط است و در زنده‌مانی گیاه نقشی حیاتی دارد. مطالعات قبلی ارتباط مثبت میان فروکتان و تحمل به تنش خشکی را نشان داده است [۲ و ۱۹]. در تنش خشکی، حذف آب غشا و افزایش پیوند واندروالس میان ترکیبات لیپیدی آن سبب تغییر ساختار غشا از فاز کریستالی - مایع بسیار سیال به فاز ژل سخت می‌شود. این مسئله خود موجب آسیب‌پذیری غشا، افزایش نفوذپذیری آن و تغییر خصوصیات مکانیکی دیواره سلولی، غشای پلاسمایی و اسکلت سلولی می‌شود [۲۰]. در چنین شرایطی قندها و بویژه فروکتان‌ها در استحکام و سازماندهی غشا نقش دارند. فروکتان با ورود بخشی از ساختار پلی‌ساکاریدی خود به میان سرهای لیپیدی غشای پلاسمایی، با گروه‌های فسفات و کولین در لیپیدها پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند و در نتیجه سبب کاهش خروج آب از میان غشا در شرایط خشکی می‌شود [۱۱]. در تحقیق حاضر مشاهدات هیستوشیمیایی و بررسی‌های کمی طی آزمایش انجماد و گرم شدن، بیانگر شدت ضریب تخریب بالا (FDC = Freeze Disrupt Coefficient) و تغییرات غشای سلول‌های بافت اپیدرمی و مزوفیل بیرونی برگ رقم حساس بود. این احتمال وجود دارد که کاهش محتوای فروکتان و در نتیجه کاهش انعطاف‌پذیری و کشش غشا دلیل اصلی آسیب‌های ایجاد شده طی تنش قطع آبیاری در این رقم بوده است. بنابراین در رقم متحمل، افزایش فروکتان می‌تواند سبب ثبات FDC پس از تنش قطع آبیاری و نیز آبیاری مجدد باشد. اندازه‌گیری شاخص‌های پایداری غشا (EL و MDA) نیز نشان داد که تنش قطع آبیاری در هر دو رقم حساس و متحمل سبب افزایش تمامیت غشا و MDA و در نتیجه افزایش هدایت الکتریکی شده که این تغییرات با آبیاری مجدد تا حدودی کاهش یافته است. با این حال، شدت تخریب غشای پلاسمایی و نشت غشایی در رقم متحمل نسبت به رقم حساس، کمتر بوده که می‌تواند با افزایش تحمل به قطع آبیاری در این رقم مرتبط باشد. به‌رغم آن که در اغلب گونه‌های گندم شدت کم پراکسیداسیون لیپیدی با تحمل به قطع

آبیاری همراه است [۱۵]. اما افزایش MDA در برخی از ژنوتیپ‌های متحمل به قطع آبیاری گزارش شده است [۴ و ۹]. در مجموع نتایج نشان می‌دهند که افزایش میزان فروکتان در دانه‌رست‌های ۴ روزه گندم طی تنش خشکی می‌تواند بخشی از مکانیسم تحمل آن به این شرایط باشد. این روند نیز با افزایش پایداری غشا و حفاظت بیشتر آن همراه است.

### منابع

1. Bajji, M., Kinet, J., Lutts, S., 2002. **The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat.** *Plant Growth Regulation*, 36, 61-70.
2. Benkeblia, N, 2022. **Insights on Fructans and Resistance of Plants to Drought Stress.** *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6.
3. Bogdan, J., and Zagdanska, B., 2009. **Alterations in sugar metabolism coincide with a transition of wheat seedlings to dehydration intolerance.** *Environmental and Experimental Botany*, 66, 186-194.
4. Chakraborty, U., and Pradhan, B., 2012. **Drought stress-induced oxidative stress and antioxidative responses in four wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties.** *Archives of Agronomy and Soil Science*, 58, 617-630.
5. Chen, B., Huang, J., Wang, J., and Huang, L., 2008. **Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*.** *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 61: 88-92.
6. Du, Z., and Bramlage, W.J., 1992. **Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1566-70.
7. Iqbal, M.S., Singh, A.K. and Ansari, M.I., 2020. **Effect of drought stress on crop production.** *New frontiers in stress management for durable agriculture*, 35-47.
8. Kawakami, A., Sato, Y., and Yoshida, M., 2008. **Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance.** *Journal of Experimental Botany*, 59, 803-814.
9. Kirova, E., Moskova, I., Geneva, M. et al., 2022. **Antioxidant potential of tolerant and susceptible wheat varieties under drought and recovery.** *Cereal Research Communications*, 50, 841-849.
10. Koobaz, P., Ghanati, F., Hosseini Salekdeh, G., Moradi, F., and Hadavand, H., 2017. **Desiccation tolerance in four-day-old seedlings of a desiccation-sensitive cultivar of wheat.** *Journal of Plant Nutrition*, 40, 574-583.
11. Livingston, D.P., Hinch, D.K., and Heyer, A.G., 2009. **Fructan and its**

- relationship to abiotic stress tolerance in plants**, *Cellular and Molecular Life Science*, 66, 2007-23.
12. Parvanova, D., Ivanov, S., Konstantinova, T., Karanov, E., Atanassov, A., Tsvetkov, T., Alexieva, V., Djilianov, D., 2004. **Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress**. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 57-63.
  13. Pour-Aboughadareh, A., Ahmadi, J., Mehrabi, A.A., Etminan, A., Moghaddam, M., and Siddique, K.H., 2017. **Physiological responses to desiccation stress in wild relatives of wheat: implications for wheat improvement**. *Acta Physiologia Plantarum*, 39, 1-16.
  14. Saeedipour, S., Moradi, F., 2011. **Comparison of the desiccation stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: impact of invertase activity on carbon metabolism during kernel development**. *Journal of Agricultural Science*, 3, 32-44.
  15. Ritsema, T., Smeekens, S.C., 2003. **Engineering fructan metabolism in plants**. *Journal of Plant Physiology*, 160, 811-820.
  16. Van den Ende, W., Coopman, M., Clerens, S., Vergauwen, R., Le Roy, K., Lammens, W., and Van Laere, A., 2011. **Unexpected presence of graminan- and levan-type fructans in the evergreen frost-hardy eudicot *Pachysandra terminalis* (Buxaceae): purification, cloning, and functional analysis of a 6-SST/6-SFT enzyme**, *Plant Physiology*, 155, 603-614.
  17. Valluru, R., Lammens, W., Claupein, W., and Van den Ende, W., 2008. **Freezing tolerance by vesicle-mediated fructan transport**, *Trends in Plant Science*, 13, 409-414.
  - Verspreet, J., Cimini, S., Vergauwen, R., Dornez, E., Locato, V., Le Roy, K., De Gara, L., Van den Ende, W., Delcour, J.A. and Courtin, C.M., 2013. **Fructan metabolism in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels**, *Plant Cell Physiology*, 54, 2047-57.
  18. Verspreet, J., Pollet, A., Cuyvers, S., Vergauwen, R., Van den Ende, W., Delcour, J.A., and Courtin, C.M., 2012. **A simple and accurate method for determining wheat grain fructan content and average degree of polymerization**. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60, 2102-07.
  19. Wang, Min, and Kit-Leong Cheong. 2023. **Preparation, Structural Characterization, and Bioactivities of Fructans: A Review** *Molecules* 28, no. 4: 1613.
  20. Wu, D., Shen, H., Yokawa, K., and Baluska, F., 2014. **Alleviation of aluminium-induced cell rigidity by overexpression of OsPIN2 in rice roots**. *Journal of Experimental Botany*, 65, 5305-15.
  21. Zadoks, J.C., Chang, T.T., and Konzak, C.F., 1974. **A decimal code for the growth stages of cereals**. *Weed Research*, 14, 415-421.