

Thiol-Based Foliar Application Mitigates Oxidative Damage and Reduces Cadmium and Lead Accumulation in Wheat Grown in Contaminated Calcareous Soil

Z. Gheshlaghi^{1*}, S.S. Hashemiaval¹

1- Department of Environmental Engineering, Faculty of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran

(*- Corresponding Author Email: zahra.gheshlaghi@ut.ac.ir)

Received: 06 June 2026

Revised: 20 August 2026

Accepted: 24 August 2026

Available Online: 24 August 2026

How to cite this article:

Gheshlaghi, Z., & Hashemiaval, S.S. (2026). Thiol-based foliar application mitigates oxidative damage and reduces cadmium and lead accumulation in wheat grown in contaminated calcareous soil. *Journal of Soil and Water*, 40(3), 293-308. (In Persian). <https://doi.org/10.22067/jsw.2026.99098.1551>

Introduction

Cadmium (Cd) and lead (Pb) contamination of calcareous soils can restrict wheat production in arid and semi-arid regions. High pH and calcium carbonate reduce metal solubility but cannot fully prevent root uptake or food-chain entry. Both metals impair nutrient acquisition, damage chloroplasts and membranes, reduce photosynthesis, and promote reactive oxygen species (ROS) production, causing oxidative damage and redox imbalance. Thiols mediate plant responses to metal stress. Cysteine (Cys) supplies sulfur for glutathione (GSH) synthesis, while glutathione supports redox buffering, antioxidant reactions, metal detoxification, and phytochelatin production. Evidence for simultaneous foliar application of cysteine and glutathione under Cd–Pb stress in wheat grown in calcareous soil remains limited. This study examined the effects of individual and combined thiol sprays on wheat growth, oxidative damage, glutathione redox status, and Cd and Pb accumulation under Cd–Pb co-contamination.

Materials and Methods

A pot experiment was conducted in a greenhouse at the Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Calcareous clay loam soil was collected from the 0–30 cm layer of agricultural land near Sabzevar, Iran. Soil pH was 7.89 (1:2.5 soil:water), electrical conductivity 2.53 dS m⁻¹, organic matter 1.03%, and calcium carbonate equivalent 24.55%. Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)-extractable Cd and Pb were 0.12 and 1.5 mg kg⁻¹, respectively, representing low background levels before contamination.

The experiment used a randomized design with five treatments and three replications (15 pots): control without metals, sprayed with deionized water; heavy metals (HM), with 15 mg Cd kg⁻¹ soil and 300 mg Pb kg⁻¹ soil; HM+Cys, with 0.41 mM L-cysteine foliar spray; HM+GSH, with 2 mM reduced glutathione; and HM+Cys+GSH, receiving 0.41 mM cysteine plus 2 mM glutathione. L-cysteine and reduced glutathione (≥99% purity) were obtained from Sigma–Aldrich.

Cadmium and Pb were added as Cd(NO₃)₂ and Pb(NO₃)₂ to 5 kg soil per pot. Nitrate input was identical among contaminated treatments and considered a common HM component. Soils were mixed and incubated for four weeks near field capacity before planting. Wheat seeds (*Triticum aestivum* L. cv. Falat) were disinfected in 5% sodium hypochlorite for 10 min, rinsed three times with deionized water, and sown in pots 23 cm in diameter and 21.5 cm high. Eight seeds per pot were thinned to five plants after establishment. Foliar treatments were applied at tillering, stem elongation, and booting; controls received equal volumes of deionized water.



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

<https://doi.org/10.22067/jsw.2026.99098.1551>

Plants were harvested about 70 days after sowing. Shoot dry biomass was measured after oven drying at 70 °C for 72 h. Total chlorophyll was determined in 80% acetone extracts at 663 and 645 nm following Lichtenthaler (1987). Malondialdehyde (MDA) and Hydrogen peroxide (H_2O_2) were measured at 532 and 390 nm, respectively. Reduced glutathione and oxidized glutathione (GSSG) were assayed in 2% metaphosphoric acid extracts using glutathione reductase, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and 2-vinylpyridine; the GSH/GSSG ratio was used to assess redox status.

Root and shoot samples were wet-digested with concentrated HNO_3 and H_2O_2 , and Cd and Pb concentrations were determined by flame atomic absorption spectrometry (AAS) (Analyst 800, PerkinElmer). Oxidative stress index (OSI), total thiol pool, tolerance index, chlorophyll protection efficiency, and transfer factor were calculated. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and means were compared using Duncan's multiple range test.

Results and Discussion

Combined Cd and Pb stress substantially reduced wheat growth. Shoot dry biomass declined from 12.50 g pot^{-1} in the control to 7.10 g pot^{-1} under HM, a 43% reduction. Total chlorophyll decreased from 2.10 to 1.10 mg g^{-1} fresh weight (47%). All thiol treatments improved both traits. Shoot biomass reached 8.60, 9.60, and 11.00 g pot^{-1} in HM+Cys, HM+GSH, and HM+Cys+GSH, respectively, while chlorophyll increased to 1.50, 1.70, and 1.90 mg g^{-1} fresh weight. Tolerance index and chlorophyll protection efficiency showed similar responses. The combined treatment produced the highest values among metal-stressed plants, although neither trait fully reached control values. Oxidative damage increased sharply under HM. MDA increased from 15.00 to 40.00 nmol g^{-1} fresh weight, while H_2O_2 increased from 4.30 to 12.20 $\mu mol\ g^{-1}$ fresh weight. Cysteine, glutathione, and their combination reduced both indices. MDA concentrations were 32.00, 27.00, and 22.00 nmol g^{-1} fresh weight in HM+Cys, HM+GSH, and HM+Cys+GSH, respectively; corresponding H_2O_2 values were 9.20, 7.50, and 6.20 $\mu mol\ g^{-1}$ fresh weight. The OSI increased from 0.05 in the control to 0.37 under HM. Cysteine reduced it to 0.17, whereas glutathione alone and the combined treatment both reduced it to 0.10. Therefore, the combined treatment did not exceed glutathione alone for this index, showing that treatment superiority differed among traits.

Cd and Pb strongly affected glutathione redox status. GSH declined from 85.30 to 32.90 nmol mg^{-1} protein under HM, whereas GSSG increased from 15.20 to 31.00 nmol mg^{-1} protein. Accordingly, the GSH/GSSG ratio declined from 5.61 to 1.07. Thiol application improved redox status in all treated plants. HM+GSH produced the highest GSH concentration, whereas HM+Cys+GSH produced the highest GSH/GSSG ratio. Under the combined treatment, GSH reached 62.70 nmol mg^{-1} protein, GSSG decreased to 10.50 nmol mg^{-1} protein, and the GSH/GSSG ratio reached 6.00. This ratio differed significantly from all stressed treatments but not from the control, indicating near-control redox restoration. Thiols also reduced Cd and Pb accumulation. Under HM, Cd concentrations were 19.0 mg kg^{-1} in roots and 7.6 mg kg^{-1} in shoots; under HM+Cys+GSH, they decreased to 10.4 and 4.0 mg kg^{-1} , respectively. Root Pb declined from 25.5 to 12.5 mg kg^{-1} , while shoot Pb declined from 9.8 to 5.5 mg kg^{-1} . Cysteine and glutathione alone also lowered both metals, although differences between HM+GSH and HM+Cys+GSH for shoot Cd and Pb were often not significant. Transfer factors for Cd and Pb remained below 0.5, indicating limited root-to-shoot translocation. Roots retained a substantial proportion of absorbed metals, reducing but not eliminating accumulation in shoots.

Conclusion

Cd-Pb co-contamination reduced wheat shoot biomass and chlorophyll, increased MDA and H_2O_2 , and disrupted glutathione redox balance. Foliar cysteine and glutathione alleviated these effects. Their combined application produced the strongest response for most growth, oxidative, redox, and tissue-metal traits, improving biomass and chlorophyll, reducing oxidative damage, restoring GSH/GSSG to a control-comparable value, and lowering Cd and Pb in roots and shoots. Transfer factors remained below 0.5, indicating limited root-to-shoot translocation. Field validation and grain-metal measurements are required before recommending this treatment for food production.

Acknowledgement

The authors acknowledge the Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, for providing greenhouse and laboratory facilities for this study.

Keywords: Ascorbate–glutathione cycle, Heavy metal stress, Redox homeostasis, Root metal immobilization, Thiol metabolism

اثر محلول پاشی برگی ترکیبات تیولی بر کاهش آسیب اکسیداتیو و تجمع کادمیوم و سرب در گندم کشت شده در یک خاک آهکی آلوده

زهرا قشلاقی^{۱*} - سید شروین هاشمی اول^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۰۲

چکیده

آلودگی هم‌زمان خاک‌های آهکی به کادمیوم و سرب، با کاهش رشد، اختلال در فتوسنتز و تشدید آسیب اکسیداتیو^۲، تولید گندم را در مناطق خشک و نیمه‌خشک محدود می‌کند و از نظر زراعی و ایمنی غذایی اهمیت ویژه‌ای دارد. با این حال، کارایی کاربرد برگی توأم سیستئین و گلوتاتیون در تعدیل اختلال ردوکسی و کاهش تجمع فلزات در گندم کشت شده در خاک آهکی آلوده، به‌طور کامل روشن نشده است. این پژوهش با هدف ارزیابی اثر محلول پاشی برگی سیستئین و گلوتاتیون، به‌صورت انفرادی و توأم، بر کاهش تنش هم‌زمان کادمیوم و سرب از طریق بهبود رشد، بازگردانی تعادل ردوکس گلوتاتیون و کاهش تجمع فلزات در گیاه گندم رقم فلان (*Triticum aestivum* L. cv. Falat) انجام شد. آزمایش به‌صورت گلدانی در گلخانه و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. کادمیوم و سرب به‌ترتیب با غلظت‌های ۱۵ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک اعمال شدند و اثر تیمارها بر زیست‌توده، غلظت کلروفیل کل، شاخص‌های آسیب اکسیداتیو، مؤلفه‌های ردوکس گلوتاتیون و غلظت فلزات در ریشه و اندام هوایی گیاه گندم بررسی شد. نتایج نشان داد که تنش فلزات سنگین، زیست‌توده خشک اندام هوایی را از ۱۲/۵۰ به ۷/۱۰ گرم در گلدان و غلظت کلروفیل کل را از ۲/۱۰ به ۱/۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر کاهش داد، در حالی که شاخص استرس اکسیداتیو (OSI) از ۰/۰۵ به ۰/۳۷ افزایش یافت و نسبت گلوتاتیون احیا به اکسید شده (GSH/GSSG) از ۵/۶۱ به ۱/۰۷ کاهش پیدا کرد. اثر تیمارها بر زیست‌توده، غلظت کلروفیل، مالون‌دی‌آلدئید، گلوتاتیون احیا شده، گلوتاتیون اکسید شده، نسبت GSH/GSSG، شاخص استرس اکسیداتیو و غلظت کادمیوم و سرب در ریشه و اندام هوایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. تیمار توأم، بیشترین اثر را در افزایش زیست‌توده اندام هوایی و غلظت کلروفیل کل، کاهش مالون‌دی‌آلدئید، بهبود وضعیت گلوتاتیون و نسبت GSH/GSSG، و کاهش تجمع کادمیوم و سرب در گیاه نشان داد و زیست‌توده را به ۱۱/۰۰ گرم در گلدان، غلظت کلروفیل را به ۱/۹۰ میلی‌گرم بر گرم و نسبت GSH/GSSG را به ۶/۰۰ رساند و هم‌زمان کادمیوم ریشه را از ۱۹/۰ به ۱۰/۴ و سرب ریشه را از ۲۵/۵ به ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش داد. با این حال، برتری این تیمار در همه شاخص‌ها یکنواخت نبود. در مجموع، محلول پاشی برگی ترکیبات تیولی، به‌ویژه تیمار توأم سیستئین و گلوتاتیون، راهبردی فیزیولوژیک و مؤثر برای کاهش تنش هم‌زمان کادمیوم و سرب در گندم بود که عمدتاً از طریق بهبود هم‌ایستایی ردوکس^۳ و کاهش تجمع فلز در بافت‌ها عمل کرد.

واژه‌های کلیدی: تعادل ردوکس، تنش فلزات سنگین، تثبیت فلزات در ریشه، چرخه آسکوربات-گلوتاتیون، متابولیسم تیولی

۱- گروه مهندسی محیط‌زیست، دانشکده محیط‌زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(*)- نویسنده مسئول: (Email: zahra.gheshlaghi@ut.ac.ir)

مقدمه

آلودگی خاک‌های کشاورزی به فلزات سنگین، یکی از مهم‌ترین چالش‌های زیست‌محیطی و زراعی در دهه‌های اخیر است؛ زیرا این آلاینده‌ها ضمن کاهش کیفیت خاک، رشد و عملکرد گیاهان زراعی را محدود کرده و از طریق ورود به زنجیره غذایی، سلامت انسان و پایداری سامانه‌های تولید را تهدید می‌کنند. در میان فلزات سنگین، کادمیم و سرب به دلیل پایداری بالا در محیط، فقدان هرگونه نقش زیستی ضروری در گیاه، سمیت شدید در غلظت‌های نسبتاً پایین و قابلیت انتقال به اندام‌های مصرفی، از مهم‌ترین عناصر خطرناک در اراضی کشاورزی به‌شمار می‌روند (Hua, 2022; Hassan, 2025; Lu, 2019). گزارش شده است که آلودگی فلزی خاک‌ها عمدتاً منشأ انسان‌زاد دارد و می‌تواند در اثر مصرف بلندمدت کودهای فسفاتی، لجن فاضلاب، پساب‌های صنعتی، فعالیت‌های معدنی و احتراق سوخت‌های فسیلی تشدید شود؛ از این‌رو کنترل آثار آن در سامانه‌های زراعی به یک اولویت پژوهشی و مدیریتی تبدیل شده است (Bystricka et al., 2019; Lu, 2019).

شواهد موجود از ایران نیز نشان می‌دهد که آلودگی خاک به کادمیم و سرب الگوی یکنواختی ندارد و شدت آن به شرایط منطقه‌ای و منابع محلی آلودگی وابسته است. به‌عنوان نمونه، در برخی خاک‌های شمال ایران در نواحی پیرامون دریاچه ارومیه، آلودگی متوسط تا شدید کادمیم و سرب گزارش شده و در بعضی مناطق، غلظت این عناصر از حدود توصیه‌شده فراتر رفته است (Hosseinpour et al., 2024). در مقابل، در برخی خاک‌های کشاورزی ایران، از جمله مزارع زعفران گناباد، غلظت کادمیم و سرب در محدوده مجاز ملی و بین‌المللی قرار داشته و خطر قابل‌توجهی از نظر سلامت گزارش نشده است (Taghavi et al., 2023). این ناهمگنی منطقه‌ای نشان می‌دهد که بررسی رفتار کادمیم و سرب و نیز راهکارهای کاهش جذب و سمیت آن‌ها در خاک‌های کشاورزی ایران، به‌ویژه در خاک‌های آهکی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

گندم (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین غله غذایی در بسیاری از کشورها است و سهم بالایی در تأمین انرژی و پروتئین جمعیت انسانی دارد؛ بنابراین هر عاملی که موجب افت رشد، کاهش عملکرد یا افزایش تجمع فلزات سنگین در این گیاه شود، از دیدگاه امنیت غذایی اهمیت ویژه‌ای پیدا می‌کند (Hua, Hassan, 2025; 2022). کادمیم و سرب می‌توانند با اختلال در جذب و جابه‌جایی عناصر غذایی، آسیب به غشاها، تخریب ساختار کلروپلاست، اختلال در زنجیره انتقال الکترون و تضعیف فرایندهای متابولیک، رشد و کارایی فتوسنتزی گیاه را به‌شدت کاهش دهند. علاوه بر این، تنش ناشی از این فلزات اغلب با تجمع گونه‌های فعال اکسیژن همراه است

و در نتیجه، پراکسیداسیون لیپیدها، اکسایش پروتئین‌ها، آسیب به اسیدهای نوکلئیک و فروپاشی نسبی هم‌ایستایی سلولی را در پی دارد (Marques, 2025; Vanbuel, 2025; Jung, 2020).

در شرایط آلودگی هم‌زمان به کادمیم و سرب، شدت آسیب معمولاً از تنش تک‌فلزی فراتر می‌رود؛ زیرا برهم‌کنش میان این دو فلز در سطح ریزوسفری، غشایی و درون سلولی می‌تواند الگوی جذب، انتقال و سم‌زدایی را پیچیده‌تر کند. کادمیم و سرب از مسیرهای انتقالی مشابه یا نزدیک به هم با کاتیون‌های دوظرفیتی ضروری رقابت می‌کنند و می‌توانند تعادل عناصر غذایی، عملکرد فتوسنتزها و وضعیت اکسایش-کاهش را مختل سازند (Liu, Hua, 2022; 2025). از سوی دیگر، در گیاهان زراعی کشت‌شده در خاک‌های آهکی، این موضوع اهمیت بیشتری دارد؛ زیرا اگرچه pH بالا و کربنات کلسیم فراوان ممکن است بخشی از فلزات را در شکل‌های کم‌تحرک‌تر نگه دارد، اما فراهمی زیستی آن‌ها به‌طور کامل حذف نمی‌شود و فلزات همچنان می‌توانند از طریق تغییرات ریزوسفری، ترشحات ریشه و پویایی فاز جامد-محلول وارد گیاه شوند (Bolan et al., 2023; Li et al., 2023; Saleem et al., 2023a). خاک‌های آهکی در بسیاری از اراضی کشاورزی مناطق خشک و نیمه‌خشک غالب‌اند و به‌دلیل pH بالا، کربنات کلسیم زیاد و ویژگی‌های شیمیایی خاص، بر تحرک و زیست‌فراهمی فلزات سنگین اثر می‌گذارند (Bolan et al., 2023). از این‌رو، کارایی روش‌های متداول اصلاح خاک، مانند بیوپار و مواد آلی، در این خاک‌ها همواره یکنواخت نیست و به نوع فلز، ویژگی‌های خاک و شرایط محیطی وابسته است (Guo et al., 2020; Li et al., 2023; Saleem et al., 2023; Uchimiya et al., 2010). بنابراین، مداخلات برگه هدف‌گیرنده سامانه دفاعی گیاه می‌توانند به‌عنوان رویکردی مکمل، و در برخی شرایط کارآمدتر از اصلاح مستقیم خاک، مطرح باشند.

سامانه تیولی مبتنی بر سیستئین و گلوتاتیون یکی از محورهای اصلی دفاع گیاه در برابر تنش فلزات سنگین است؛ به‌طوری‌که سیستئین با تأمین گوگرد احیاشده، پیش‌ساز اصلی سنتز گلوتاتیون به‌شمار می‌رود و گلوتاتیون نیز در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن، حفظ وضعیت ردوکس، پایداری غشاها و چرخه آسکوربات-گلوتاتیون نقش دارد و همچنین پیش‌ماده مستقیم سنتز فیتوکلانتین‌ها برای کیلیت‌سازی و سم‌زدایی فلزات است (Rai, Marques, 2025; Wu, 2024). از نظر بیوشیمیایی، کارایی این سامانه به فراهمی سیستئین و فعالیت آنزیم‌های کلیدی بیوسنتز گلوتاتیون، به‌ویژه در مرحله تشکیل- γ -گلوتامیل سیستئین، وابسته است؛ بنابراین، در تنش شدید و هم‌زمان کادمیم و سرب، مصرف هم‌زمان گلوتاتیون

دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. برای اجرای آزمایش، نمونه خاک سطحی از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متری از اراضی کشاورزی اطراف سبزوار برداشت شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، خاک در دمای محیط هواخشک شد و سپس از الک ۲ میلی متری عبور داده شد تا بقایای درشت گیاهی، سنگریزه‌ها و ذرات ناهمگن حذف و یکنواختی فیزیکی نمونه‌ها فراهم شود. بر اساس روش (Gee & Bauder, 1986)، خاک مورد استفاده دارای بافت Clay loam، pH برابر ۷/۸۹، هدایت الکتریکی عصاره اشباع برابر ۲/۵۳ دسی‌زیمنس بر متر، ماده آلی ۱/۰۳ درصد و کربنات کلسیم معادل ۲۴/۵۵ درصد بود. همچنین غلظت اولیه کادمیوم و سرب قابل استخراج با DTPA به ترتیب ۰/۱۲ و ۱/۵ میلی گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد (Analyst 800; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA, Reynolds, 1989) که نشان می‌دهد خاک پایه، پیش از اعمال تیمارهای آزمایشی، آلودگی زمینه‌ای شدیدی نداشته است و در محدوده‌ای پایین‌تر از مقادیر بحرانی گزارش شده برای خاک‌های کشاورزی با کشت گندم قرار داشته است (Six & Smolders, 2014a, 2019). انتخاب این خاک به دلیل ماهیت آهکی و شباهت آن به خاک‌های رایج مناطق خشک و نیمه‌خشک انجام شد؛ خاک‌هایی که به واسطه pH بالا، غلبه کربنات‌ها و ویژگی‌های شیمیایی خاص، رفتار متفاوتی در نگهداشت و فراهمی عناصر غذایی و فلزات سنگین از خود نشان می‌دهند (Bolan et al., 2023). ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بر اساس روش‌های متداول آزمایشگاهی (Westerman, 1990) تعیین شد (جدول ۱).

طرح آزمایش و تیمارها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و سه تکرار، در مجموع ۱۵ واحد آزمایشی، انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) شاهد، بدون آلودگی فلزی و با محلول پاشی آب مقطر؛ ۲) تنش فلزات سنگین (HM)، شامل آلودگی هم‌زمان خاک به ۱۵ میلی گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک و ۳۰۰ میلی گرم سرب بر کیلوگرم خاک؛ ۳) HM + Cys، شامل تنش فلزی به همراه محلول پاشی برگی سیستئین با غلظت ۰/۴۱ میلی مولار؛ ۴) HM + GSH، شامل تنش فلزی به همراه محلول پاشی برگی گلوپاتیون با غلظت ۲ میلی مولار و ۵) HM + Cys + GSH، شامل تنش فلزی به همراه محلول پاشی هم‌زمان سیستئین و گلوپاتیون با همان غلظت‌های مذکور.

در خنثی‌سازی ROS و سنتز فیتوکلاتین‌ها می‌تواند به کاهش GSH^۱، افزایش GSSG^۲ و افت نسبت GSH/GSSG^۳ منجر شود که نشانه اختلال در هم‌ایستایی ردوکس و تضعیف ظرفیت دفاعی گیاه است (Zhang et al., 2005; Kopylova, 2023).

کاربرد برون‌زاد سیستئین و گلوپاتیون می‌تواند از دو مسیر مکمل به کاهش تنش فلزات سنگین کمک کند؛ به طوری که سیستئین با تقویت تأمین پیش‌سازهای سنتز گلوپاتیون و ترکیبات گوگردار، و گلوپاتیون با بهبود وضعیت ردوکس و پشتیبانی از چرخه آسکوربات-گلوپاتیون، ظرفیت دفاعی گیاه را افزایش می‌دهند (Gheshlaghi & Jung, 2020; Rai, 2023; Kafi, 2026). با وجود این، شواهد مربوط به اثر هم‌زمان این دو ترکیب در گندم در شرایط تنش توأم کادمیوم و سرب، به‌ویژه در خاک آهکی، هنوز محدود است و همین موضوع ضرورت بررسی تجربی آن را برجسته می‌کند. همچنین، اگرچه در سال‌های اخیر از تعدیل‌کننده‌های شیمیایی، مواد آلی، نانوذرات و تنظیم‌کننده‌های متابولیسم برای کاهش تنش فلزات سنگین استفاده شده است، کارایی این مداخلات به‌شدت به نوع خاک، گونه گیاهی، نوع فلز و شدت تنش وابسته است (Gulsah et al., 2024; Shang, 2024). از این‌رو، ارزیابی تیمارهای تیولی در خاک آهکی و شرایط آلودگی هم‌زمان Cd و Pb، با سنجش شاخص‌های رشدی، رنگیزه‌ای، اکسیداتیو، ردوکسی و الگوی تجمع فلز، برای تبیین دقیق‌تر پاسخ گندم ضروری است.

با توجه به آنچه بیان شد، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر محلول پاشی برگی سیستئین و گلوپاتیون، به‌صورت انفرادی و ترکیبی، بر رشد، محتوای کلروفیل، شاخص‌های استرس اکسیداتیو^۴، وضعیت گلوپاتیون و الگوی تجمع و انتقال کادمیوم و سرب در گندم رقم فلات کشت‌شده در خاک آهکی آلوده انجام شد. فرض اصلی پژوهش این بود که تیمارهای تیولی، به‌ویژه کاربرد توأم سیستئین و گلوپاتیون، بتوانند از طریق بهبود وضعیت ردوکس و کاهش شدت آسیب اکسیداتیو، آثار منفی تنش فلزات سنگین را تعدیل کنند؛ هرچند تبیین دقیق مکانیسم‌های مولکولی و درون‌سلولی فراتر از دامنه داده‌های این مطالعه است و بر اساس شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مورد بحث قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

ویژگی‌های خاک و آماده‌سازی گلدان‌ها

این پژوهش به‌صورت آزمایش گلدانی در شرایط گلخانه‌ای در

- 1 Reduced glutathione
- 2- Oxidized glutathione
- 3- Ratio of reduced to oxidized glutathione
- 4- Oxidative Stress Index

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 1- Initial physicochemical characteristics of the soil utilized in the experiment

ویژگی‌ها Property	واحد Unit	مقدار Value	روش‌ها Method
بافت خاک Textural class	-	Clay Loam	مثلث بافت خاک USDA textural triangle
pH (نسبت ۱:۲/۵ خاک به آب) pH (1:2.5 soil:water)	-	7.89	اندازه‌گیری در سوسپانسیون خاک و آب با نسبت ۱:۲/۵ ، با استفاده از pH متر Measurement in 1:2.5 soil:water suspension using pH meter
هدایت الکتریکی Electrical Conductivity (ECe)	dS m ⁻¹	2.53	عصاره‌گیری از گل اشباع خاک Saturated Paste Extract
ماده آلی Organic Matter (OM)	%	1.03	روش والکی-بلاک Walkley-Black Method
کربنات کلسیم معادل CaCO ₃ Equivalent (TNV)	%	24.55	روش کلسیمتر Calcimeter Method
کادمیم قابل استخراج با DTPA DTPA-extractable Cd	mg kg ⁻¹	0.12	عصاره‌گیری با دی تی پی ای DTPA Extraction
سرب قابل استخراج با DTPA DTPA-extractable Pb	mg kg ⁻¹	1.5	عصاره‌گیری با دی تی پی ای DTPA Extraction

در هر گلدان کاهش یافت تا تراکم یکنواختی میان واحدهای آزمایشی برقرار شود.

سیستئین (L-cysteine, purity ≥99%) و گلوپاتیون کاهش‌یافته (reduced glutathione, purity ≥99%) از شرکت سیگما آلدردیج تهیه شد و محلول‌پاشی برگی تیمارهای سیستئین و گلوپاتیون به‌ترتیب با غلظت‌های ۰/۴۱ و ۲ میلی‌مولار (به‌ترتیب معادل ۵۰ و ۶۱۵ میلی‌گرم در لیتر)، در سه مرحله کلیدی رشد رویشی گندم شامل آغاز پنجه‌زنی، ساقه‌رفتن و بستن خوشه انجام شد. انتخاب این غلظت‌ها بر اساس مطالعات پیشین انجام گرفت (Shang, 2024; Lu, 2019)؛ و زمان‌بندی محلول‌پاشی نیز با توجه به حساسیت فیزیولوژیک گیاه در این مراحل و نقش سیستئین و گلوپاتیون در تنظیم پاسخ آنتی‌اکسیدانی و تعادل ردوکس در نظر گرفته شد (Sun & Yang, 2006; Rai, 2023). در تیمار شاهد، در هر مرحله محلول‌پاشی، به‌جای محلول تیولی، همان حجم آب مقطر به‌صورت برگی اعمال شد تا اثر عملیات محلول‌پاشی (اسپری) و آب همراه در همه تیمارها یکسان باشد و تنها تفاوت، حضور یا عدم حضور ترکیبات تیولی باشد.

اندازه‌گیری صفات رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی

در پایان دوره رشد، حدود ۷۰ روز پس از کاشت، گیاهان برداشت شدند و اندام هوایی از ریشه جدا شد. برای اندازه‌گیری زیست‌توده خشک اندام هوایی، نمونه‌ها پس از شست‌وشوی ملایم برای حذف ذرات خاک، در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۷۲ ساعت خشک شدند و سپس با ترازوی دیجیتال توزین شدند. این صفت

برای ایجاد آلودگی فلزی، مقادیر محاسبه‌شده از نمک‌های نیتراتی کادمیم و سرب به خاک هر گلدان ۵ کیلوگرمی افزوده شد، افزودن این نمک‌ها به‌طور ضمنی منجر به ورود مقدار محدودی نیترات (NO₃⁻) به خاک شد؛ با توجه به این‌که سطوح آلودگی فلزی و به‌تبع آن مقدار نیترات همراه در همه تیمارهای آلوده (HM)، (HM+Cys+GSH، HM+GSH، HM+Cys) یکسان بود، اثر نیترات به‌عنوان مؤلفه مشترک بین این تیمارها تلقی و اختلاف میانگین صفات عمدتاً به حضور یا عدم حضور ترکیبات تیولی نسبت داده شد. پس از اختلاط کامل با خاک، گلدان‌ها به‌مدت حدود چهار هفته در شرایط رطوبتی نزدیک به ظرفیت مزرعه نگهداری شدند تا توزیع فلزات در خاک یکنواخت شده و تعادل نسبی بین فازهای جامد و محلول برقرار شود. این مرحله برای شبیه‌سازی بهتر شرایط تماس ریشه با فلزات و جلوگیری از مواجهه آنی و غیرواقعی گیاه با آلودگی فلزی انجام شد و با رویکردهای به‌کاررفته در مطالعات مشابه سازگار است (Shang, 2024; Lu, 2019).

کاشت، استقرار گیاه و محلول‌پاشی

بذرهای گندم رقم فلات (*Triticum aestivum* L. cv. Falat) از شرکت کیمیا تجارت زر تهیه و پیش از کاشت با محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند تا هرگونه اثر احتمالی عوامل میکروبی یا مواد سطحی به حداقل برسد. در هر گلدان (حاوی ۵ کیلوگرم با ابعاد ۲۳ سانتی‌متر قطر و ۲۱/۵ سانتی‌متر ارتفاع) تعداد ۸ بذر کشت شد و پس از سبز شدن و استقرار اولیه گیاهچه‌ها، تعداد بوته‌ها به ۵ بوته

نمونه‌ها با استفاده از اسید نیتریک غلیظ و پراکسید هیدروژن انجام شد تا محلولی شفاف و مناسب برای سنجش عناصر به‌دست آید. سپس غلظت کادمیوم و سرب در محلول نهایی با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی شعله‌ای (AAS، مدل Analyst 800، برند PerkinElmer) اندازه‌گیری شد.

محاسبه شاخص‌های تنش

به‌منظور تفسیر دقیق‌تر پاسخ گیاه به تنش فلزات سنگین و تیمارهای اعمال‌شده، چند شاخص مشتق‌شده نیز محاسبه شد. شاخص استرس اکسیداتیو از نسبت غلظت هیدروژن پراکسید به غلظت گلوکاتایون احیا شده به‌دست آمد ($OSI = \frac{H_2O_2}{GSH}$) تا تصویری فشرده از توازن بین بار اکسیداتیو و ظرفیت دفاع تیولی ارائه دهد. ذخیره کل تیول بر اساس مجموع GSH و دو برابر GSSG محاسبه شد ($TTP = GSH + (2 \times GSSG)$) تا برآوردی از اندازه استخر کل ترکیبات تیولی در دسترس حاصل شود. شاخص تحمل (TI) به‌صورت نسبت زیست‌توده خشک اندام هوایی در هر تیمار به میانگین شاهد و به شکل درصد محاسبه شد. (معادله ۱)

$$TI(\%) = \left(\frac{\text{Shoot biomass under stress}}{\text{Mean shoot biomass of control}} \right) \times 100 \quad (1)$$

همچنین کارایی حفاظت از کلروفیل (CPE) از نسبت غلظت کلروفیل کل هر تیمار به شاهد و به‌صورت درصد محاسبه گردید (Hassan, 2025). (معادله ۲)

$$CPE(\%) = \left(\frac{\text{Total chlorophyll in treatment}}{\text{Total chlorophyll in control}} \right) \times 100 \quad (2)$$

و برای ارزیابی انتقال نسبی فلزات از ریشه به اندام هوایی نیز فاکتور انتقال (TF) از نسبت غلظت فلز در اندام هوایی به ریشه به‌دست آمد (Wu, 2024). (معادله ۳)

$$TF = \frac{\text{Metal concentration in shoot}}{\text{Metal concentration in root}} \quad (3)$$

تحلیل آماری

پیش از انجام تجزیه آماری، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد تا اعتبار فرض نرمالیتی برای انجام تحلیل واریانس ارزیابی گردد. سپس داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (one-way analysis of variance) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. این تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS (نسخه ۲۶) انجام شد. در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمارها، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) انجام گرفت و ترسیم شکل‌ها با نرم‌افزار Origin انجام شد.

به‌عنوان یکی از شاخص‌های اصلی رشد و تحمل گیاه نسبت به تنش فلزات سنگین در نظر گرفته شد. برای تعیین غلظت کلروفیل کل، مقدار مشخصی از بافت تازه برگ در استون ۸۰ درصد استخراج شد و جذب نوری عصاره در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (WPA S2000, Cary, North Carolina, U.S.A) در محل آزمایشگاه مرکزی دانشگاه تهران قرائت و سپس غلظت کلروفیل کل بر اساس روش لیچنتالر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987). اندازه‌گیری غلظت کلروفیل کل به‌عنوان شاخصی از وضعیت دستگاه فتوسنتزی و شدت آسیب ناشی از تنش فلزی انجام شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو و مؤلفه‌های ردوکس گلوکاتایون

برای ارزیابی شدت استرس اکسیداتیو، مقدار مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اندازه‌گیری شد. سنجش این ترکیب با استفاده از واکنش تیوباریتوریک‌اسید انجام و جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید (Heath, 1968). همچنین غلظت هیدروژن پراکسید با روش مبتنی بر واکنش با یدید پتاسیم و اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۳۹۰ نانومتر تعیین شد. این دو صفت برای توصیف شدت آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش کادمیوم و سرب و نیز ارزیابی میزان کارایی تیمارهای تیولی در کاهش این آسیب انتخاب شدند (Jung, 2020; Vanbuel, 2025).

برای اندازه‌گیری GSH و GSSG، نمونه‌های تازه برگ در اسید متاسفریک ۲ درصد سرد استخراج و پس از سانتریفیوژ، سوپرناتانت برای سنجش به‌کار رفت. گلوکاتایون کل به روش آنزیمی-طیف‌سنجی با استفاده از DTNB، NADPH و گلوکاتایون ردوکتاز اندازه‌گیری شد و برای سنجش GSSG، عصاره با ۲-vinylpyridine تیمار گردید. در نهایت، مقدار GSH از تفاضل گلوکاتایون کل و GSSG محاسبه و نسبت GSH/GSSG به‌عنوان شاخص وضعیت ردوکس سلولی گزارش شد (Griffith, 1980). این نسبت یکی از شاخص‌های حساس برای ارزیابی پایداری محیط احیایی سلول در برابر تنش‌های اکسیداتیو است و کاهش آن معمولاً نشانه غلبه شرایط اکسیداتیو بر ظرفیت دفاعی گیاه تلقی می‌شود (Rai, Jung, 2020; 2023).

اندازه‌گیری غلظت کادمیوم و سرب در گیاه

برای تعیین غلظت کادمیوم و سرب در ریشه و اندام هوایی، نمونه‌های خشک گیاهی پس از آسیاب‌شدن تا رسیدن به پودر یکنواخت، تحت هضم تر قرار گرفتند (Westerman, 1990). هضم

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر تیمار بر صفات رشدی، رنگزدایی، اکسیداتیو، ردوکسی و غلظت کادمیم و سرب در گندم
Table 2. Analysis of variance for the effects of treatments on growth, pigment, oxidative, redox, and cadmium and lead concentration traits in wheat

منبع تغییر / S.O.V.	df	درجه آزادی /	زیست توده / Biomass	غلظت کلروفیل کل / chlorophyll concentration	MDA	GSH	GSSG	GSH/GS SG	OSI	TTP	Tl	CPE	Cd ریشه / Root Cd	Cd اندام هوایی / Shoot Cd	Pb ریشه / Root Pb	Pb اندام هوایی / Shoot Pb
تیمار / Treatment	4	13.119**		0.444**	272.10**	1151.44**	178.761**	12.926**	0.04803**	501.726**	839.616**	1006.82**	14.73**	3.18**	39.81**	8.99**
خطا / Error	8	0.0645		0.0025	1.836	8.790	1.274	0.1297	0.00044	6.002	4.128	5.713	0.208	0.138	0.392	0.231
ضرب / تغییرات / CV (%)	—	2.60		3.01	4.98	4.81	5.72	9.55	13.24	2.42	2.60	3.02	4.8	8.2	4.5	7.9
LSD _{0.05}	—	0.462		0.091	2.465	5.394	2.053	0.655	0.038	4.457	3.696	4.348	1.4	1.1	1.8	1.3

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمار بر صفات اصلی مورد بررسی شامل زیست‌توده خشک اندام هوایی، غلظت کلروفیل کل، مالون‌دی‌آلدئید، گلوتاتیون احیاشده، گلوتاتیون اکسیدشده، نسبت GSH/GSSG، شاخص استرس اکسیداتیو، ذخیره کل تیول و نیز غلظت کادمیم و سرب در ریشه و اندام هوایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). این الگو نشان می‌دهد که تنش هم‌زمان کادمیم و سرب، پاسخ گندم را در سطوح رشدی، فیزیولوژیک، اکسیداتیو و ردوکسی به‌طور گسترده تحت تأثیر قرار داده و تیمارهای تیولی نیز توانسته‌اند شدت این اختلالات را تعدیل کنند.

زیست‌توده اندام هوایی، غلظت کلروفیل کل و شاخص‌های مشتق‌شده

تنش هم‌زمان کادمیم و سرب موجب کاهش معنی‌دار زیست‌توده خشک اندام هوایی از ۱۲/۵۰ گرم در گلدان در شاهد به ۷/۱۰ گرم در گلدان در تیمار HM شد؛ یعنی حدود ۴۳ درصد افت نسبت به شاهد (جدول ۳). کاربرد برگ‌ی سیستین و گلوتاتیون، این کاهش را تا حدی جبران کرد؛ به‌طوری‌که زیست‌توده در تیمارهای HM+Cys و HM+GSH به‌ترتیب به ۸/۶۰ و ۹/۶۰ گرم در گلدان رسید و بیشترین مقدار در میان تیمارهای در شرایط تنش در تیمار HM+Cys+GSH با ۱۱/۰۰ گرم در گلدان مشاهده شد. با توجه به مقدار $LSD_{0.05}$ برای زیست‌توده (۰/۴۶۲)، اختلاف بین همه این میانگین‌ها معنی‌دار بود؛ بنابراین تیمار ترکیبی از نظر بازیابی رشد، به‌طور معنی‌داری از تیمارهای انفرادی کارا تر بود، هرچند همچنان به سطح شاهد نرسید.

شاخص تحمل نیز همین روند را تأیید کرد؛ به‌طوری‌که این شاخص از ۱۰۰ درصد در شاهد به ۵۶/۸۰ درصد در تیمار HM کاهش یافت، اما در تیمارهای HM+Cys، HM+GSH و HM+Cys+GSH به‌ترتیب به ۶۸/۸۰، ۷۶/۸۰ و ۸۸/۰۰ درصد افزایش پیدا کرد (جدول ۳). اختلاف این میانگین‌ها نیز با توجه به $LSD_{0.05}$ برابر ۳/۶۹۶ همگی معنی‌دار بود و نشان داد که تیمار توأم، بیشترین ظرفیت را برای حفظ رشد در شرایط تنش فلزی داشته است. این بهبود رشد را می‌توان با کاهش فشار اکسیداتیو و حفظ بهتر کارکردهای متابولیکی تبیین کرد؛ زیرا کادمیم و سرب معمولاً با رقابت با کاتیون‌های دوظرفیتی ضروری، اختلال در انتقال عناصر غذایی و آسیب به ساختارهای فتوسنتزی موجب محدودیت رشد

می‌شوند (Marques, 2025Hua, 2022).

روند تغییرات غلظت کلروفیل کل نیز با پاسخ زیست‌توده هم‌سو بود. تنش فلزی، غلظت کلروفیل کل را از ۲/۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر در شاهد به ۱/۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر در تیمار HM کاهش داد که بیانگر افتی معادل ۴۷ درصد بود (جدول ۳). محلول‌پاشی سیستین و گلوتاتیون به‌ترتیب این مقدار را به ۱/۵۰ و ۱/۷۰ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر افزایش داد و تیمار ترکیبی با ۱/۹۰ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر، بیشترین غلظت کلروفیل را در بین گیاهان در شرایط تنش نشان داد. از آنجاکه $LSD_{0.05}$ کلروفیل کل برابر ۰/۰۹۱ بود، اختلاف بین تمام میانگین‌ها معنی‌دار بود و بنابراین ترتیب اثر تیمارها به‌صورت شاهد $HM+Cys+GSH > HM+GSH > HM$ قابل دفاع است.

شاخص کارایی حفاظت از کلروفیل نیز از ۵۲/۴۰ درصد در تیمار HM به ۷۱/۴۰، ۸۰/۹۷ و ۹۰/۵۰ درصد در تیمارهای HM+Cys، HM+GSH و HM+Cys+GSH افزایش یافت و برتری تیمار ترکیبی نسبت به تیمارهای انفرادی از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۳). این الگو نشان می‌دهد که کاربرد تیول‌ها، به‌ویژه در حالت توأم، توانسته است شدت تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی را کاهش دهد. از نظر فیزیولوژیک، افت غلظت کلروفیل در حضور کادمیم و سرب معمولاً با اختلال در جذب و جابه‌جایی عناصر معدنی، آسیب به کلروپلاست، برهم‌خوردن زنجیره انتقال الکترون و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن مرتبط است و بنابراین هر عاملی که تعادل ردوکس را بهبود دهد، می‌تواند به حفظ ساختار فتوسنتزی کمک کند (Rai, 2023Liu, 2025).

شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آسیب غشایی

تنش هم‌زمان کادمیم و سرب موجب افزایش شدید شاخص‌های آسیب اکسیداتیو شد. غلظت MDA از ۱۵/۰۰ نانومول بر گرم وزن‌تر در شاهد به ۴۰/۰۰ نانومول بر گرم وزن‌تر در تیمار HM افزایش یافت که نشانه تشدید پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در اثر تنش فلزی است (جدول ۴). کاربرد سیستین، گلوتاتیون و تیمار ترکیبی به‌ترتیب MDA را به ۳۲/۰۰، ۲۷/۰۰ و ۲۲/۰۰ نانومول بر گرم وزن‌تر کاهش داد. با توجه به $LSD_{0.05}$ برابر ۲/۴۶۵، تمام این اختلاف‌ها معنی‌دار بودند و بنابراین تیمار ترکیبی مؤثرترین تیمار در کاهش آسیب غشایی ناشی از تنش بود.

غلظت هیدروژن پراکسید نیز از ۴/۳۰ میکرومول بر گرم وزن‌تر در شاهد به ۱۲/۲۰ میکرومول بر گرم وزن‌تر در تیمار HM افزایش یافت و سپس در تیمارهای HM+Cys، HM+GSH و HM+Cys+GSH به‌ترتیب به ۹/۲۰، ۷/۵۰ و ۶/۲۰ میکرومول بر

بلکه هر دو تیمار در کاهش عدم تعادل اکسیداتیو کارایی مشابهی نشان دادند.

ذخیره کل تیول از ۱۱۵/۷۰ نانومول بر گرم وزن تر در شاهد به ۹۰/۹۴ در تیمار HM کاهش یافت و در تیمار HM+Cys به ۸۳/۷۰ در HM+GSH به ۱۱۱/۷۰ و در HM+Cys+GSH به ۸۳/۷۰ نانومول بر گرم وزن تر رسید (جدول ۴). بر اساس $LSD_{0.05}=4/457$ تیمار HM+Cys+GSH کمترین مقدار TTP را به طور معنی دار نشان داد، در حالی که اختلاف بین شاهد و HM+GSH از نظر آماری معنی دار نبود. این کاهش TTP در تیمار ترکیبی را نمی توان به صورت قطعی به یک مکانیسم واحد نسبت داد، اما می توان آن را به عنوان نشانه ای از مصرف بیشتر تیول ها در فرآیندهای دفاعی و سم زدایی در نظر گرفت؛ تفسیری که با نقش گلوپاتیون و مشتقات آن در پاسخ به تنش فلزات سنگین سازگار است (Wu, 2024; Marques, 2025).

گرم وزن تر کاهش پیدا کرد (جدول ۴). روند میانگین ها نشان می دهد که هر سه تیمار تیولی شدت بار اکسیداتیو را کاهش داده اند و تیمار گلوپاتیون و به ویژه تیمار ترکیبی از نظر عددی مؤثرتر از سیستمین به تنهایی بوده اند.

شاخص استرس اکسیداتیو نیز از ۰/۰۵ در شاهد به ۰/۳۷ در تیمار HM افزایش یافت که بیانگر غلبه شرایط اکسیداتیو بر ظرفیت دفاعی مبتنی بر گلوپاتیون است (جدول ۴). محلول پاشی سیستمین این شاخص را به ۰/۱۷ و محلول پاشی گلوپاتیون و تیمار ترکیبی هر دو آن را به ۰/۱۰ کاهش دادند. با توجه به $LSD_{0.05}$ برابر ۰/۳۸، کاهش OSI در تیمارهای HM+GSH و HM+Cys+GSH نسبت به HM و HM+Cys معنی دار بود، اما بین M+GSH و HM+Cys+GSH اختلاف معنی داری وجود نداشت. در نتیجه، بر اساس این شاخص، تیمار ترکیبی از گلوپاتیون به تنهایی برتر نبود،

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر صفات رشدی، رنگیزه ای و شاخص های مشتق شده گندم

Table 3- Comparison of the effects of various treatments on growth characteristics, photosynthetic pigments, and derived indices of wheat

تیمار Treatment	CPE (%)	TI (%)	غلظت کلروفیل کل Total chlorophyll Concentration (mg g ⁻¹ FW)	زیست توده Biomass (g pot ⁻¹)
شاهد Control	100.00 ± 1.39 a	100.00 ± 1.44 a	2.10 ± 0.03 a	12.50 ± 0.18 a
تنش HM	52.40 ± 1.39 e	56.80 ± 1.51 e	1.10 ± 0.03 e	7.10 ± 0.19 e
تنش + سیستمین HM+ Cys	71.40 ± 1.39 d	68.80 ± 1.06 d	1.50 ± 0.03 d	8.60 ± 0.13 d
تنش + گلوپاتیون HM+ GSH	80.97 ± 1.36 c	76.80 ± 0.83 c	1.70 ± 0.03 c	9.60 ± 0.10 c
تنش + سیستمین + گلوپاتیون HM+Cys+GSH	90.50 ± 1.39 b	88.00 ± 0.83 b	1.90 ± 0.03 b	11.00 ± 0.10 b

داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده اند (n = ۳). در هر ستون، میانگین هایی که حداقل یک حرف کوچک انگلیسی مشترک دارند، در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی دار ندارند. TI: شاخص تحمل؛ CPE: کارایی حفاظت از کلروفیل؛ FW: وزن تر

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر شاخص های استرس اکسیداتیو گندم

Table 4- Comparison of the mean effects of different treatments on oxidative stress indices in wheat

تیمار	TTP (nmol g ⁻¹ FW)	OSI	H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ FW)	MDA (nmol g ⁻¹ FW)
شاهد Control	115.70 ± 2.91 a	0.05 ± 0.00 d	4.30 ± 0.15 e	15.00 ± 0.40 e
تنش HM	94.90 ± 0.86 c	0.37 ± 0.02 a	12.20 ± 0.38 a	40.00 ± 0.79 a
تنش + سیستمین HM+ Cys	99.60 ± 0.32 b	0.17 ± 0.01 b	9.20 ± 0.21 b	32.00 ± 0.98 b
تنش + گلوپاتیون HM+ GSH	111.70 ± 0.60 a	0.10 ± 0.01 c	7.50 ± 0.17 c	27.00 ± 0.83 c
تنش + سیستمین + گلوپاتیون HM+Cys+GSH	83.70 ± 0.57 d	0.10 ± 0.00 c	6.20 ± 0.21 d	22.00 ± 0.78 d

داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده اند (n = ۳). در هر ستون، میانگین هایی که حداقل یک حرف کوچک انگلیسی مشترک دارند، در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی دار ندارند. MDA: مالون دی آلدئید؛ H₂O₂ پراکسید هیدروژن؛ OSI: شاخص تنش اکسیداتیو؛ TTP: ذخیره کل تیول؛ FW: وزن تر

به‌طور کلی، افزایش MDA، H_2O_2 و OSI در تیمار HM تأیید می‌کند که تنش توأم کادمیم و سرب موجب برهم‌خوردن تعادل اکسایش-کاهش و تشدید شاخص استرس اکسیداتیو در گندم شده است. کاهش این شاخص‌ها در تیمارهای تیولی، به‌ویژه در حضور گلوتاتیون، نشان می‌دهد که تأمین مستقیم یا غیرمستقیم ترکیبات تیولی می‌تواند بخشی از خسارت ناشی از ROS را کاهش دهد؛ موضوعی که با نقش شناخته‌شده گلوتاتیون در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون و پایداری وضعیت ردوکس سلول هم‌خوانی دارد (Jung, Rai, 20232020).

افزایش شدید GSH و نسبت GSH/GSSG در تیمار HM نشان می‌دهد که گندم در شرایط تنش توأم Cd و Pb با فشار شدید بر استخر گلوتاتیون^۱ مواجه شده است (شکل ۱). این الگو با این مفهوم سازگار است که گلوتاتیون در شرایط تنش فلزی باید هم‌زمان در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن و در مسیرهای سم‌زدایی فلزات مشارکت کند و به همین دلیل ذخیره احیاء آن کاهش می‌یابد (Jung, 2020; Wu, 2024Gheshlaghi & Kafi, 2026). به‌بود نسبت GSH/GSSG در تیمارهای تیولی، به‌ویژه در تیمار ترکیبی، نشان می‌دهد که این تیمارها توانسته‌اند ظرفیت احیایی سلول را تا حد زیادی بازسازی کنند. به عبارتی تأمین سیستمین احتمالاً از طریق تقویت دسترسی به پیش‌سازهای بیوسنتز گلوتاتیون و تأمین گلوتاتیون برون‌زاد احتمالاً از طریق پشتیبانی مستقیم از سامانه دفاع ردوکسی، به بهبود هم‌ایستایی گلوتاتیون کمک کرده است (Hothorn et al., Rai, 2023; Zhang et al., 20052006).

غلظت کادمیم و سرب در ریشه و اندام هوایی و فاکتور انتقال

غلظت هر دو فلز در ریشه و اندام هوایی تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت. در تیمار HM، غلظت کادمیم در ریشه و اندام هوایی به‌ترتیب ۱۹/۰ و ۷/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود، در حالی که این مقادیر در تیمار HM+Cys به ۱۵/۵ و ۵/۲، در HM+GSH به ۱۴/۲ و ۴/۸ و در HM+Cys+GSH به ۱۰/۴ و ۴/۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافت. بر اساس $LSD_{0.05}$ معادل ۱/۴ برای Cd ریشه، تیمار ترکیبی به‌طور معنی‌داری کمتر از همه تیمارهای دیگر بود، اما اختلاف بین HM+Cys و HM+GSH برای Cd ریشه معنی‌دار نبود، زیرا ۱/۳ واحد و کمتر از $LSD_{0.05}$ بود. برای Cd اندام هوایی نیز با توجه به $LSD_{0.05}$ برابر ۱/۱، تیمار HM+Cys+GSH به‌طور معنی‌داری کمتر از HM و HM+Cys بود، اما با HM+GSH اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۲).

برای سرب نیز روند مشابهی مشاهده شد. غلظت سرب در ریشه از ۲۵/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در HM به ۱۹/۸ در HM+Cys، ۱۷/۸ در HM+GSH و ۱۲/۵ در HM+Cys+GSH کاهش یافت و با توجه به $LSD_{0.05}$ برابر ۱/۸، اختلاف بین همه این میانگین‌ها معنی‌دار

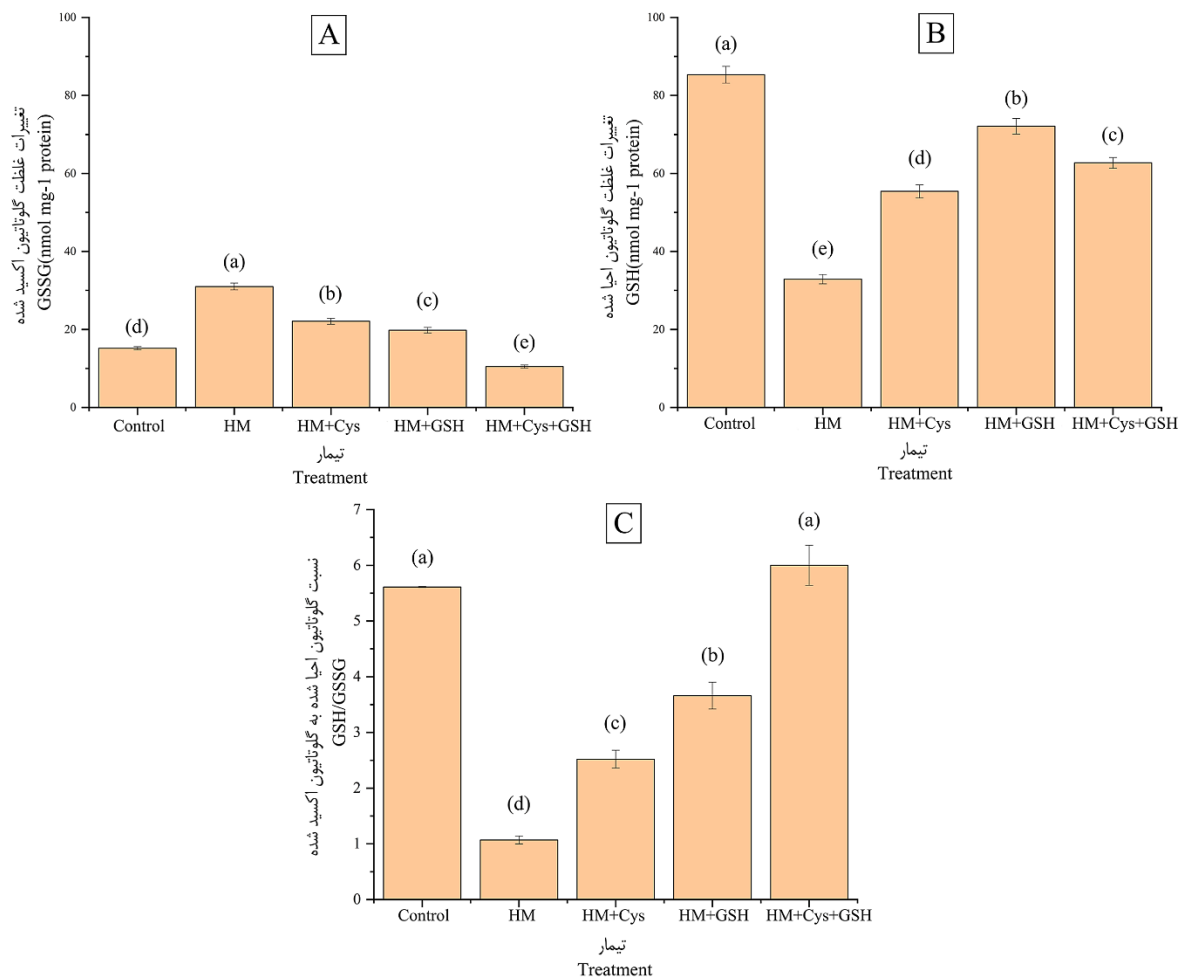
هم‌ایستایی سیستم گلوتاتیون و تعادل ردوکسی هم‌ایستایی سیستم گلوتاتیون به توانایی سلول در حفظ تعادل میان شکل احیاء گلوتاتیون (GSH) و شکل اکسیدشده آن (GSSG) از طریق تنظیم سنتز، بازتولید و مصرف این ترکیبات گفته می‌شود. تعادل ردوکس نیز بیانگر وضعیت نسبی اکسایش-کاهش درون‌سلولی است و نسبت GSH/GSSG یکی از شاخص‌های مهم آن به‌شمار می‌رود؛ به‌طوری‌که کاهش این نسبت معمولاً نشان‌دهنده غلبه شرایط اکسیدکننده و تضعیف ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه است. تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمار بر غلظت GSH، GSSG و نسبت GSH/GSSG در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). یکی از روشن‌ترین پاسخ‌های گیاه به تنش فلزی در این پژوهش، تغییر در اجزای سامانه گلوتاتیون بود. در تیمار HM، غلظت GSH از ۸۵/۳۰ نانومول بر میلی‌گرم پروتئین در شاهد به ۳۲/۹۰ کاهش یافت، در حالی که GSSG از ۱۵/۲۰ به ۳۱/۰۰ نانومول بر میلی‌گرم پروتئین افزایش پیدا کرد. در نتیجه، نسبت GSH/GSSG از ۵/۶۱ در شاهد به ۱/۰۷ در تیمار HM کاهش یافت که به‌خوبی نشان‌دهنده جابه‌جایی محیط درون‌سلولی به سمت وضعیت اکسیداتیو است (شکل ۱).

کاربرد سیستمین، GSH را به ۵۵/۴۰ و نسبت GSH/GSSG را به ۲/۵۲ رساند، در حالی که گلوتاتیون برون‌زاد این مقادیر را به‌ترتیب به ۷۲/۱۰ و ۳/۶۶ افزایش داد. در تیمار HM+Cys+GSH، GSH برابر ۶۲/۷۰، GSSG برابر ۱۰/۵۰ و نسبت GSH/GSSG برابر ۶/۰۰ گزارش شد. بر اساس مقدار $LSD_{0.05}$ برای GSH برابر ۵/۳۹۴، هر سه تیمار تیولی در مقایسه با HM موجب افزایش معنی‌دار GSH شدند و HM+GSH از HM+Cys و HM+Cys+GSH نیز GSH بیشتری داشت.

برای GSSG نیز اختلاف‌ها معنی‌دار بود و تیمار HM+Cys+GSH کمترین مقدار را در بین همه تیمارها نشان داد. از آنجاکه $LSD_{0.05}$ برای نسبت GSH/GSSG برابر ۰/۶۵۵ است، نسبت ۶/۰۰ در تیمار ترکیبی به‌طور معنی‌داری از HM،

ترکیبی، توانسته‌اند تجمع هر دو فلز را در گیاه کاهش دهند، اما شدت این کاهش در همه اجزا و برای هر دو فلز یکسان نبوده است. کاهش غلظت فلزات در بافت گیاه می‌تواند با کاهش آسیب غشایی، بهبود تعادل ردوکس، و احتمالاً افزایش ظرفیت کمپلکس‌سازی درون‌سلولی مرتبط باشد (Marques, 2025; Wu, Gupta et al., 2013; 2024).

بود. غلظت سرب در اندام هوایی نیز از ۹/۸ در HM به ۷/۵، ۶/۵ و ۵/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سه تیمار تیولی کاهش یافت. با این حال، برای Pb اندام هوایی و با $LSD_{0.05}$ برابر ۱/۳، تیمار HM+Cys+GSH فقط نسبت به HM و HM+Cys کاهش معنی‌دار نشان داد و با HM+GSH اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۲). این داده‌ها نشان می‌دهد که تیمارهای تیولی، به‌ویژه تیمار

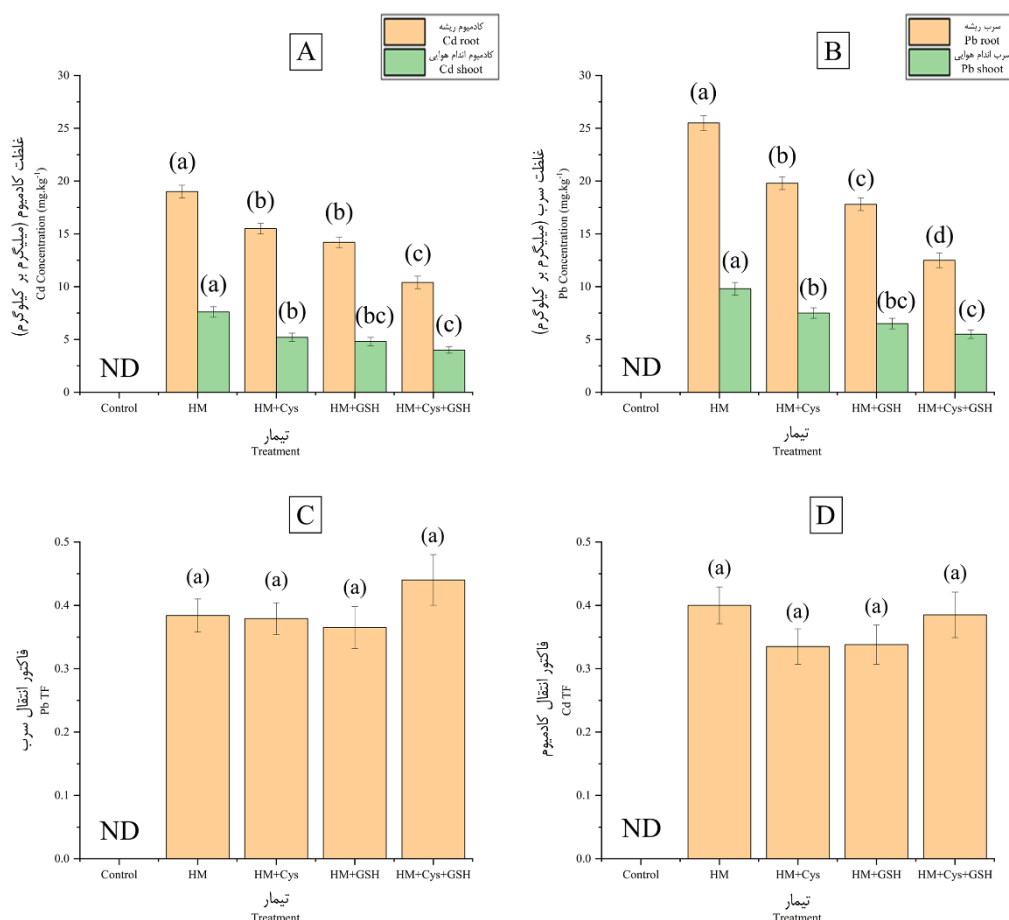


شکل ۱- تغییرات غلظت گلوپتایون اکسیدشده (A) (GSSG)، گلوپتایون احیاشده (B) (GSH) و نسبت (C) GSH/GSSG در گیاه گندم تحت تأثیر تیمارهای مختلف در شرایط تنش فلزات سنگین

ستون‌ها میانگین سه تکرار را نشان می‌دهند و میله‌های خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد میانگین هستند ($n = 3$). حروف کوچک انگلیسی متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد هستند؛ ستون‌هایی که دست‌کم یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی‌دار ندارند. HM: تنش هم‌زمان فلزات سنگین؛ Cys: سیستئین؛ GSH: گلوپتایون احیاشده.

Figure 1- Changes in oxidized glutathione (GSSG) concentration (A), reduced glutathione (GSH) concentration (B), and GSH/GSSG ratio (C) in wheat plants as affected by different treatments under heavy metal stress

Bars represent means of three replicates and vertical error bars indicate the standard error of the mean ($n = 3$). Different lowercase letters above bars indicate significant differences among treatment means at $P \leq 0.05$; bars sharing at least one letter are not significantly different. HM: combined heavy metal stress; Cys: cysteine; GSH: reduced glutathione



شکل ۲- غلظت کادمیم در ریشه و اندام هوایی (A)، غلظت سرب در ریشه و اندام هوایی (B)، فاکتور انتقال سرب (C) و فاکتور انتقال کادمیم (D) در گیاه گندم تحت تأثیر کاربرد برگی سیستئین و گلوتاتیون در شرایط تنش همزمان فلزات سنگین

ستون‌ها میانگین سه تکرار را نشان می‌دهند و میله‌های خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد میانگین هستند (n = 3). حروف کوچک انگلیسی متفاوت بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد هستند؛ ستون‌هایی که دست‌کم یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی‌دار ندارند. ND: غیرقابل تشخیص؛ HM: تنش همزمان فلزات سنگین؛ Cys: سیستئین؛ GSH: گلوتاتیون احیاشده؛ TF: فاکتور انتقال.

Figure 2- Cadmium concentration in roots and shoots (A), lead concentration in roots and shoots (B), lead transfer factor (C), and cadmium transfer factor (D) in wheat plants as affected by foliar application of cysteine and glutathione under combined heavy metal stress

Bars represent means of three replicates and vertical error bars indicate the standard error of the mean (n = 3). Different lowercase letters above bars indicate significant differences among treatment means at $P \leq 0.05$; bars sharing at least one letter are not significantly different. ND: not detected; HM: combined heavy metal stress; Cys: cysteine; GSH: reduced glutathione; TF: transfer factor.

رشد، کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی، افزایش آسیب اکسیداتیو و فروپاشی نسبی تعادل ردوکس در گندم شد. تیمارهای تیولی توانستند این اختلالات را تا حدی تعدیل کنند و در بیشتر شاخص‌های اصلی، تیمار HM+Cys+GSH بهترین پاسخ را در میان تیمارهای در شرایط تنش نشان داد.

نتیجه‌گیری

تنش همزمان کادمیم و سرب در خاک آهکی باعث کاهش معنی‌دار رشد و کارایی فتوسنتزی گندم و همزمان موجب تشدید

فاکتور انتقال کادمیم در تیمار HM برابر ۰/۴۰ بود و در تیمارهای HM+Cys و HM+GSH به ۰/۳۴ کاهش یافت، اما در تیمار HM+Cys+GSH به ۰/۳۸ رسید. فاکتور انتقال سرب نیز از ۰/۳۸ در HM به ۰/۳۸ در HM+Cys، ۰/۳۷ در HM+GSH و ۰/۴۴ در HM+Cys+GSH تغییر یافت (شکل ۲). تمام مقادیر TF برای هر دو فلز کمتر از ۰/۵ بودند که نشان می‌دهد انتقال از ریشه به اندام هوایی در همه تیمارها محدود بوده و ریشه نقش سد اصلی در برابر جابه‌جایی این فلزات را ایفا کرده است. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که تنش توأم کادمیم و سرب در خاک آهکی باعث افت

پایین بودن فاکتور انتقال در همه تیمارها و نقش بازدارنده ریشه در جابه‌جایی فلزات، نتایج این پژوهش بیش از آن‌که مؤید افزایش قطعی تثبیت گیاهی باشد، بیانگر کاهش تجمع فلز و حفظ الگوی انتقال محدود در گیاه گندم است. در مجموع، محلول‌پاشی توأم سیستمین و گلوتاتیون را می‌توان یک راهبرد فیزیولوژیک مؤثر و قابل استفاده برای کاهش آسیب ناشی از تنش توأم کادمیم و سرب در گندم کشت‌شده در خاک آهکی دانست. برای تعمیم این نتایج، انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای، اندازه‌گیری غلظت فلزات در دانه، و بررسی مستقیم شاخص‌های مولکولی و بیوشیمیایی مانند فیتوکلاتین‌ها، فعالیت آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم گلوتاتیون و الگوی تفکیک زیرسلولی فلزات ضروری است.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به‌منظور حمایت از این طرح پژوهشی صمیمانه قدردانی می‌کنند.

آسیب اکسیداتیو و برهم‌خوردن تعادل ردوکس سلولی شد. کاهش زیست‌توده اندام هوایی، افت غلظت کلروفیل کل، افزایش مالون‌دی‌آلدئید و هیدروژن پراکسید، و کاهش شدید نسبت GSH/GSSG نشان داد که فشار فلزی اعمال‌شده، سامانه دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه را به‌طور جدی مختل کرده است. محلول‌پاشی برگ‌ی سیستمین و گلوتاتیون هر دو توانستند بخشی از آثار زیان‌بار تنش فلزی را تعدیل کنند، اما در مجموع، تیمار توأم سیستمین + گلوتاتیون بهترین پاسخ کلی را در بیشتر صفات اصلی نشان داد. این تیمار بیشترین بازایی زیست‌توده و غلظت کلروفیل کل را در میان گیاهان در شرایط تنش ایجاد کرد، غلظت MDA و GSSG را به حداقل رساند، نسبت GSH/GSSG را تا سطحی مشابه شاهد بازگرداند، و کمترین غلظت مشاهده‌شده کادمیم و سرب را در بافت‌های گیاه ثبت کرد. تیمار ترکیبی سیستمین و گلوتاتیون اگرچه در بیشتر صفات پاسخ مطلوب‌تری ایجاد کرد، برتری آن در همه شاخص‌ها یکنواخت و مطلق نبود. در برخی صفات، از جمله شاخص استرس اکسیداتیو و غلظت فلزات در اندام هوایی، تفاوت این تیمار با گلوتاتیون به‌تنهایی در همه موارد معنی‌دار نبود. همچنین، با وجود

References

- Bolan, N., Srivastava, P., Rao, C.S., Satyanaraya, P., Anderson, G.C., Bolan, S., Nortjé, G.P., Kronenberg, R., Bardhan, S., & Abbott, L.K. (2023). Distribution, characteristics and management of calcareous soils. *Advances in Agronomy*, 182, 81-130. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2023.06.002>
- Bystricka, J., Kovarovic, J., Musilova, J., Arvay, J., & Harangozo, L. (2019). The quality of contamination of agriculturally used soils by risky metals in southern Slovakia. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 19(3.2), 553-560. <https://doi.org/10.5593/sgem2019/3.2/s13.072>
- Gee, G.W., & Bauder, J.W. (1986). Particle-size analysis In A. Klute (Ed.) 2nd ed. *Methods of soil analysis: Part 1 Physical and mineralogical methods*, 5, 383-411. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c15>
- Gheshlaghi, Z., & Kafi, M. (2026). Synergistic cysteine-glutathione foliar application enhances wheat tolerance to cadmium-lead co-stress in calcareous soils: Mechanisms and phytoremediation implications. *Plant Stress*, Article 101234. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2026.101234>
- Griffith, O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry*, 106(1), 207-212. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)
- Gulsah, B., Faizan, M., Sultan, H., Alam, P., Albalawi, T., & Ahmad, S. (2025). Hormone-nanoparticle synergy: co-application of melatonin and nano-biochar enhances soybean resilience to arsenic stress via modulation of proline metabolism and oxidative stress markers. *Plant Stress*, 101026. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2025.101026>
- Guo, M., Song, W., & Tian, J. (2020). Biochar-facilitated soil remediation: mechanisms and efficacy variations. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 521512. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.521512>
- Gupta, D.K., Vandenhoove, H., & Inouhe, M. (2013). Role of phytochelatin in heavy metal stress and detoxification mechanisms in plants In D. K. Gupta, F. J. Corpas, & J. M. Palma (Eds.). In *Heavy metal stress in plants* (pp. 73-94). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38469-1_4
- Hassan, R.F., Jeber, F.J., & Kareem, F.T. (2025). Determination of some heavy metals concentrations in green and yellow wheat crops from Iraqi fields: A comparative analysis of heavy metal accumulation. *Environmental Monitoring and Assessment*, 197(8), Article 522. <https://doi.org/10.1007/s10661-025-13981-z>
- Heath, R.L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hosseinpoor, S., Habibi, S., & Mohammadi, A. (2024). Understanding heavy metal contamination in the vicinity of Lake Urmia, NW Iran: Environmental and health Perspectives. *Heliyon*, 10(13). <https://doi.org/10.1016/>

- j.heliyon.2024.e34198
12. Hothorn, M., Wachter, A., Gromes, R., Stuwe, T., Rausch, T., & Scheffzek, K. (2006). Structural basis for the redox control of plant glutamate cysteine ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 27557-27565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602770200>
13. Hua, Y.P., Chen, J.F., Zhou, T., Zhang, T.Y., Shen, D.D., Feng, Y.N., & Yue, C.P. (2022). Multiomics reveals an essential role of long-distance translocation in regulating plant cadmium resistance and grain accumulation in allohexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Experimental Botany*, 73(22), 7516-7537. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac364>
14. Jung, H.I., Lee, B.R., Chae, M.J., Lee, E.J., Lee, T.G., Jung, G.B., Kim, M.S., & Lee, J. (2020). Ascorbate-mediated modulation of cadmium stress responses: Reactive oxygen species and redox status in *Brassica napus*. *Front Plant Science*, 11, 586547. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.586547>
15. Kang, Y., Qin, H., Wang, G., Lei, B., Yang, X., & Zhong, M. (2024). Selenium nanoparticles mitigate cadmium stress in tomato through enhanced accumulation and transport of sulfate/selenite and polyamines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(3), 1473-1486. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c07504>
16. Kopylova, V.S., Boronovskiy, S.E., Nartsissov, Y.R. (2023). Simulation modeling of glutamate cysteine ligase activity. *Biophysics (Russian Federation)*. <https://doi.org/10.1134/S0006350923020100>
17. Li, H., Li, Z., Huang, L., Mao, X., Dong, Y., Fu, S., Su, R., Chang, Y., & Zhang, C. (2023). Environmental factors influence the effects of biochar on the bioavailability of Cd and Pb in soil under flooding condition. *Water, Air, & Soil Pollution*, 234(2), 100. <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06130-0>
18. Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology*, (148), 350-382. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
19. Liu, W., Liu, J., Yang, K., Zhou, Y., Yang, F., Li, C., & Xiong, S. (2025). Insights into the SULTR gene family of *Solanum americanum*: Genome-wide identification, expression profiling, and functional response to cadmium stress. *Plant Stress*, 18, 101003. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2025.101003>
20. Lu, Y., Wang, Q. F., Li, J., Xiong, J., Zhou, L.N., He, S.L., Zhang, J.Q., Chen, Z.A., He, S.G., & Liu, H. (2019). Effects of exogenous sulfur on alleviating cadmium stress in tartary buckwheat. *Scientific Reports*, 9(1), Article 7397. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43901-4>
21. Marques, D.N., Thiengo, C.C., & Azevedo, R.A. (2025). Phytochelatins and cadmium mitigation: Harnessing genetic avenues for plant functional manipulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4767. <https://doi.org/10.3390/ijms26104767>
22. Rai, G.K., Kumar, P., Choudhary, S.M., Singh, H., Adab, K., Kosser, R., Magotra, I., Kumar, R.R., Singh, M., Sharma, R., Corrado, G., & Roupheal, Y. (2023). Antioxidant potential of glutathione and crosstalk with phytohormones in enhancing abiotic stress tolerance in crop plants. *Plants*, 12(5), 1133. <https://doi.org/10.3390/plants12051133>
23. Reynolds, H.L. (1989). Association of official analytical chemists: 1964–1988. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*, 109-136. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7086-4_3
24. Saleem, A., Ur Rahim, H., Khan, U., Irfan, M., Akbar, W., Akbar, Z., & Alatalo, J. (2023). Organic materials amendments can improve NPK availability and maize growth by reducing heavy metals stress in calcareous soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 21(3), 2533-2546. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-05135-w>
25. Shang, H., Li, Y., Zhang, Y., Hou, J., Zhao, X., Xu, X., Wu, L., & Li, Q. (2024). Biosynthesized selenium nanoparticles as an effective tool to combat soil metal stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *ACS Nano*, 18(11), 8432–8447. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.3c10888>
26. Six, L., & Smolders, E. (2014). Future trends in soil cadmium concentration under current cadmium fluxes to European agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 485, 319-328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.109>
27. Sun, X., & Yang, Z. (2006). Plant sulfate assimilation and regulation of the activity of related enzymes under cadmium stress. *Zhi wu Sheng li yu fen zi Sheng wu xue xue bao= Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32(1), 9-16.
28. Taghavi, M., Darvishiyan, M., Momeni, M., Eslami, H., Fallahzadeh, R.A., & Zarei, A. (2023). Ecological risk assessment of trace elements (TEs) pollution and human health risk exposure in agricultural soils used for saffron cultivation. *Scientific Reports*, 13(1), 4556. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31681-x>
29. Uchimiya, M., Lima, I.M., Klasson, K.T., & Wartelle, L.H. (2010). Contaminant immobilization and nutrient release by biochar soil amendment: roles of natural organic matter. *Chemosphere*, 80(8), 935-940. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.020>
30. Vanbuel, I., Iven, V., Depaepe, T., Heleven, M., Jozefczak, M., Smeets, K., Hernández, L.E., Prinsen, E., Van Der Straeten, D., Hendrix, S., & Cuypers, A. (2025). Cadmium-induced ER stress, autophagy and ethylene biosynthesis in leaves and roots of *Arabidopsis thaliana* and their dependence on stress intensity. *Plant Stress*, 18,

100996. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2025.100996>
31. Westerman, R.L. (1990). *Soil testing and plant analysis*.
32. Wu, C., Zhang, J., Chen, M., Liu, J., & Tang, Y. (2024). Characterization of a *Nicotiana tabacum* phytochelatin synthase 1 and its response to cadmium stress. *Frontiers in Plant Science*, 15, Article 1418762. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1418762>
33. Zhang, H., Forman, H. J., & Choi, J. (2005). γ -Glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods in enzymology*, 401, 468-483. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01028-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01028-1)