**Carotenoids in roots indicated the level of stress induced by mannitol and sodium azide treatment during the early stages of maize germination**

Lázaro Hernández1\* · Daviel Gómez1 · Bárbara Valle1 · Christoph C. Tebbe2 · Richard Trethowan3 · Rosa Acosta4 ·Lourdes Yabor1 · José Carlos Lorenzo1

1 Laboratory for Plant Breeding, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila 69450, Cuba. E-mail: lazaro@bioplantas.cu. URL: [www.bioplantas.cu](http://www.bioplantas.cu/).

2 Thünen Institute of Biodiversity, Federal Research Institute for Rural Areas, Forestry and Fisheries, Braunschweig, Germany; E-mail: christoph.tebbe@thuenen.de

3 The University of Sydney, Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture and Environment, Australia; richard.trethowan@sydney.edu.au

4  National Institute for Agricultural Sciences (INCA), Carretera Tapaste, Km 3, San José de las Lajas, 32700 La Habana, Cuba

**Abstract**

Chemical mutagens, such as sodium azide, have attracted the interest of plant breeders. Azide creates DNA point mutations and affects plant growth and development, disturbs metabolic activity and inhibits protein and DNA replication, whereas mannitol is used to simulate drought stresses in tissue culture. To identify biochemical markers for stress tolerance, maize seeds were germinated under mannitol and sodium azide induced stress in controlled conditions for 7 days. Then levels of chlorophyll, carotenoids, phenolics and aldehydes produced were subsequently determined. Germination percentage was not affected by either mannitol or sodium azide and was always above 85%. However, total fresh weight decreased by 50% with the application of 153.4 mM mannitol and 0.26 mM azide in combination. This treatment significantly reduced plantlet growth from 0.94 g in the control to 0.53 g in the treated materials. Root weight reduced by 68.1%, cotyledons by 14.3%, stems by 65.0% and leaves by 70.0% in treated samples. The level of carotenoids in roots was the clearest biochemical indicator of stress produced by the mannitol and sodium azide treatment. Carotenoids increased from 0.01 μg g− 1 fresh weight in the control to 9.03 μg g− 1 fresh weight in the treated materials. A large-scale seed treatment with mannitol and sodium azide was carried out. 2296 seeds were placed in magenta containers with 153.4 mM mannitol and 0.26 mM NaN3. At 7 days of germination, the heaviest seedlings (450) (450/2296 = 20%) were transferred to soil environment. Forty-two plants (42/450 = 9.3%) were off-type phenotypes at 45 days. Genetic variants may have been obtained following the novel procedure described here which combines chronic treatment with sodium azide and selection pressure with mannitol to simulate drought conditions.

**Keywords**: Plant breeding, Induced mutagenesis, Drought tolerance

Resumen:

Los mutágenos químicos, como la azida sódica, han atraído el interés de los fitomejoradores. La azida crea mutaciones puntuales en el ADN y afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas, altera la actividad metabólica e inhibe la replicación de proteínas y ADN, mientras que el manitol se usa para simular las tensiones por sequía en el cultivo de tejidos. Para identificar marcadores bioquímicos para la tolerancia al estrés, las semillas de maíz se germinaron bajo estrés con la presencia de manitol y azida de sodio en condiciones controladas durante 7 días. Posteriormente se determinaron los niveles de clorofila, carotenoides, fenóles y aldehídos. El porcentaje de germinación no se vió afectado ni por el manitol ni por la azida de sodio y siempre estuvo por encima del 85%. Sin embargo, el peso fresco total disminuyó en un 50% con la aplicación de 153,4 mM de manitol y 0,26 mM de azida. Este tratamiento redujo significativamente el crecimiento de las plántulas de 0,94 g en el control a 0,53 g en los materiales tratados. El peso de la raíz se redujo en 68.1%, los cotiledones en 14.3%, los tallos en 65.0% y las hojas en 70.0% en las muestras tratadas. El nivel de carotenoides en las raíces fue el indicador bioquímico más claro del estrés producido por el tratamiento con manitol y azida de sodio. Los carotenoides aumentaron de 0.01 μg g -1 peso fresco en el control a 9.03 μg g -1 peso fresco en los materiales tratados. Se realizó un tratamiento de semillas a gran escala con manitol y azida sódica. Se colocaron 2296 semillas en recipientes de magenta con 153,4 mM de manitol y 0,26 mM de NaN3. A los 7 días de germinación, las plántulas más pesadas (450) (450/2296 = 20%) se transfirieron al ambiente del suelo. Cuarenta y dos plantas (42/450 = 9.3%) fueron fenotipos fuera de tipo a los 45 días. Se pueden haber obtenido variantes genéticas siguiendo el nuevo procedimiento descrito aquí que combina el tratamiento crónico con azida de sodio y la presión de selección con manitol para simular condiciones de sequía.

Palabras clave: Mejoramiento Genético, Mutagénesis inducida, Tolerancia sequía.