

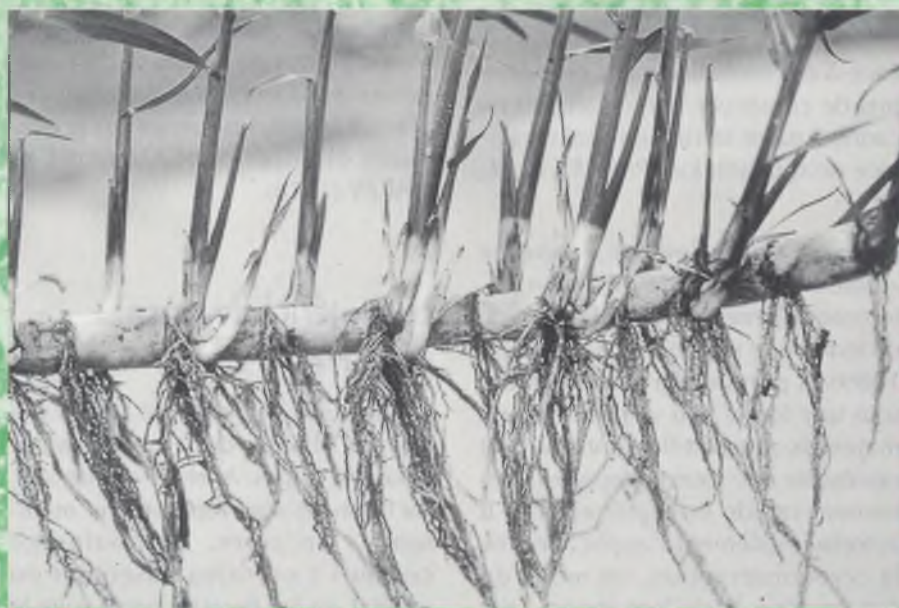
# Les biotechnologies en soutien à la diffusion variétale chez la canne à sucre

**Diffusion et échanges variétaux chez la canne à sucre bénéficient aujourd'hui des progrès en biotechnologie. Une collection de variétés *in vitro* a été constituée pour autoriser un accès rapide à du matériel de grande qualité agronomique et garanti sain.**

La canne à sucre se multiplie par bouturage, donc chaque variété est un clone. La création d'une nouvelle variété par hybridation est un processus particulièrement long et coûteux pour la canne à sucre. Les raisons en sont d'abord d'ordre génétique. Les variétés présentent un génome très complexe, avec 100 à 130 chromosomes issus de plusieurs espèces ancestrales. Chaque croisement provoque la déstructuration complète des caractéristiques des variétés parentales ; seule une proportion infime des descendants présente un potentiel agronomique. L'évaluation de ce potentiel constitue la deuxième source de

complexité. Le cycle de production de la canne à sucre comprend plusieurs récoltes, avec un premier stade dit « en vierge », un an après la plantation des boutures. Il est suivi de plusieurs repousses, dont les caractéristiques sont peu corrélées d'un stade à l'autre, en particulier entre le stade « en vierge » et les repousses successives. De plus, pour un même stade, on observe des comportements variables selon le milieu et l'année. Ainsi, la sélection des clones les plus performants demande des dispositifs d'évaluation particulièrement lourds.

Les différents centres de sélection du monde produisent des variétés adap-



F. PAULET, J.-C. GLASZMANN  
CIRAD/CA, BP 5035,  
34032 Montpellier Cedex 1, France

Démarrage des bourgeons axillaires  
de la canne à sucre.  
Cliché R. Fauconnier



tées à leur région. Ces matériels éprouvés peuvent avoir une grande valeur en tant que géniteurs dans d'autres programmes d'amélioration variétale. Ils peuvent également se révéler adaptés en dehors de leur zone de sélection et représenter ainsi une source de renouvellement des variétés pour des stations qui ne possèdent pas leur propre programme d'amélioration génétique. La circulation des variétés de canne à sucre, difficiles à sélectionner, représente donc un facteur de progrès important.

Le matériel végétal transite sous forme de boutures qui sont susceptibles de propager des maladies. Depuis 1978, le service de « Quarantaine internationale » organisé par le CIRAD à Montpellier (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) met à la disposition de nombreux pays des variétés d'intérêt industriel ou des matériels proches de ce niveau. Deux cycles d'observation d'un an sont nécessaires pour obtenir les garanties phytosanitaires requises ; les clones peuvent ensuite être expédiés à leurs utilisateurs sous forme de boutures (BAUDIN, 1984). Du fait de contraintes matérielles, ce service se cantonne à une activité de transit et ne peut pas conserver les clones « libérés » à l'issue de la quarantaine.

Face à ces limitations, il a été entrepris de constituer une collection de canne à sucre *in vitro* en aval du service de quarantaine (PAULET *et al.*, 1991).

Ce type de collection, appelée « vitrothèque », existe déjà pour différentes plantes, comme la pomme de terre ou le manioc (ROCCA *et al.*, 1989). Il permet le rassemblement sous une forme peu volumineuse de matériels potentiellement utiles et représente une source d'approvisionnement rapide en matériel sain. Il autorise également l'application de la cryoconservation, un mode de conservation à très long terme, utile pour la préservation des ressources génétiques. Le recours à l'électrophorèse d'enzymes et aux nouveaux



Stockage à 18 °C des plantules *in vitro*.  
Cliché CIRAD-CA

outils de la biologie moléculaire vient renforcer une gestion rigoureuse de la collection.

## La production des plants *in vitro*

Les plants *in vitro*, dits « vitroplants », sont obtenus par culture de bourgeons axillaires prélevés sur des plantes saines, en suivant les procédures définies par SAUVAIRE et GALZY (1978).

## Le matériel de base en serre

Un bouturage est effectué à partir des plantes libérées de la quarantaine, garanties saines. Après le démarrage, les boutures sont repiquées et maintenues en serre. Le bouturage conduit à un rajeunissement du végétal, ce qui favorise par la suite le développement des bourgeons lors de la mise en culture *in vitro*. Afin de minimiser les attaques de

champignons saprophytes, indésirables ultérieurement *in vitro*, des traitements hebdomadaires fongicides et insecticides systémiques sont réalisés en alternance.

## La culture *in vitro*

Les bourgeons les plus jeunes (trois ou quatre par tige) sont prélevés sur des cannes de quatre à six mois, dans la serre de Montpellier. Ils sont mis en culture en boîte de pétri sur milieu MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) à 25 °C. Ils sont repiqués individuellement en tube au bout de deux à quatre semaines, lorsque de nouvelles talles sont apparus. Lorsque 10 belles plantules ont pu être obtenues, elles sont repiquées séparément dans 10 tubes et stockées à 18 °C sur milieu MS appauvri. Ces conditions entraînent un ralentissement de la croissance *in vitro* et donc diminuent le volume de manipulations nécessaires. La surveillance régulière du niveau du milieu nutritif et du dessèchement des feuilles permet de détecter les clones à repiquer en priorité. L'intervalle entre deux repiquages peut varier entre 6 mois et deux ans selon les variétés (capacité de tallage) et l'épuisement du milieu.

Bourgeon de canne à sucre après 15 jours de repiquage *in vitro*.  
Cliché CIRAD-CA





## L'utilisation des vitroplants

Les vitroplants permettent l'introduction rapide d'une nouvelle variété dans une plantation. Ils peuvent être directement convertis en boutures ou faire l'objet d'une multiplication accélérée par micropropagation *in vitro* (FELDMANN et ROTT, 1991).

## La fourniture de vitroplants

Dès qu'une demande est formulée, une partie des vitroplants disponibles en vitrothèque à Montpellier, est replacée à 25 °C pour multiplication. Trois à six mois sont nécessaires pour produire une dizaine de nouvelles plantules par tallage naturel. Ces plantules sont alors repiquées sur un milieu d'enracinement et expédiées. L'utilisateur, s'il dispose du laboratoire adapté, pourra poursuivre la multiplication en suivant les mêmes procédures. Le délai d'attente pour la fourniture de plants est donc réduit à six mois alors que deux à trois ans seraient nécessaires pour réinsérer les variétés demandées dans un nouveau cycle de quarantaine.

## Le comportement des plants issus de culture *in vitro*

Au moment du sevrage — passage des conditions *in vitro* aux conditions naturelles —, il est essentiel de suivre rigoureusement le protocole fourni pour optimiser la reprise au champ (cf. Fiche de sevrage de vitroplants de canne à sucre). Les vitroplants de canne à sucre repiqués au champ présentent un faciès particulier, différent de celui des plants issus de boutures traditionnelles (FELDMANN et ROTT, 1991). Ces modifications dépendent de la variété, mais se traduisent généralement par une augmentation du tallage et une diminution du diamètre des tiges. Ce qui conduit d'ailleurs à un rendement similaire à celui des boutures. Ces différences s'estompent rapidement au cours des cycles de multiplication.

## L'état actuel de la vitrothèque

Créée en 1982, la vitrothèque de canne à sucre du CIRAD à Montpellier est constituée à l'heure actuelle de 363 variétés dont la

majorité est établie et conservée à 18 °C. L'augmentation de son volume a conduit à rechercher diverses améliorations.

## Contenu de la collection

La collection comporte 187 variétés internationales d'accès libre et 176 variétés dont l'accès est soumis à l'autorisation de l'obteneur (Fiche variétés de canne à sucre conservées en vitrothèque).

## Stabilité génétique et technique de cryoconservation

Bien que la stabilité génétique semble *a priori* garantie par le maintien à l'état de tissu organisé (bourgeon ou plantule, sans dédifférenciation cellulaire) sur des milieux de culture exempts d'hormones de croissance, il est utile de rechercher une technique permettrait de s'affranchir des manipulations sur vitroplants et surtout de limiter les multiplications cellulaires en conditions artificielles. Une technique de cryoconservation (DEREUDDRE, 1994) est maintenant disponible. Mise au point sur la variété Co 6415, cette méthode permet de stocker des apex encapsulés dans des billes d'alginate et plongés dans l'azote liquide. Elle a été testée avec succès sur 16 variétés, conduisant à des taux de régénération compris entre 14 % et 91 % (GONZALEZ ARNAO *et al.*, 1993 ; PAULET *et al.*, 1993). En théorie, elle permet une conservation d'une durée indéfinie du matériel végétal.

## Contrôle de l'identité du matériel

Du fait du grand nombre de manipulations entre l'arrivée d'un clone sous forme de boutures et son envoi sous forme de vitroplants, le contrôle de l'identité des clones est nécessaire pour détecter les éventuelles erreurs d'étiquetage. L'électrophorèse



Reprise de l'apex à 10 jours, après cryoconservation.  
Cliché P. Feldmann

se d'enzymes fournit un moyen de vérification. Une étude pilote conduite sur 62 variétés a révélé 21 bandes polymorphes, c'est-à-dire présentes chez certaines variétés et absentes chez d'autres. A partir des 1 891 comparaisons effectuées (62 variétés comparées deux à deux), seuls deux couples n'ont pas pu être distingués ; chacune des autres 58 variétés présente une combinaison unique de bandes. Cette technique requiert l'extraction des enzymes à partir d'une jeune feuille fraîche, et donc la disponibilité d'une jeune plante. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN (RFLP) est plus lourd à révéler mais présente une puissance de discrimination bien supérieure. Ils fournissent une véritable empreinte génétique de chaque variété. Au contraire de l'électrophorèse d'enzymes, l'analyse des RFLP est réalisable à partir de feuilles séchées ; on peut ainsi à tout moment comparer les clones de la collection de Montpellier à d'autres clones conservés au champ sous les tropiques.

## Conclusion

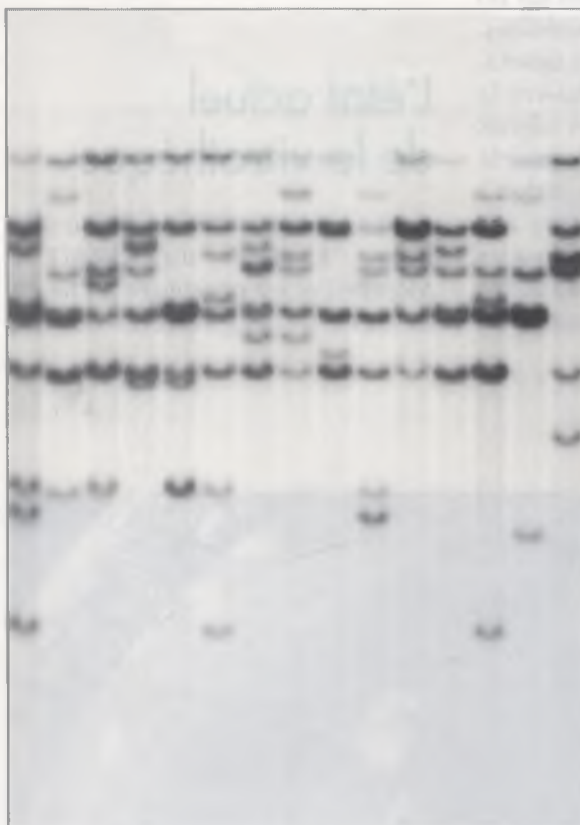
Les biotechnologies sont parfois utilisées pour créer une diversité nouvelle et originale ; c'est le cas par exemple de la transformation génétique. Dans le cas de la collection de variétés de canne à sucre décrite ici, les biotechnologies sont appliquées pour assurer l'intégrité génétique de matériels précieux ; elles offrent un moyen de maintenir des centaines, voire des milliers de variétés dans un espace très restreint en les protégeant totalement des insectes, des maladies et des aléas climatiques, mais aussi en grande partie de la dérive génétique et de mélanges accidentels. D'intérêt immédiat pour la diffusion de matériel variétal, ce type de dispositif aura probablement sa place dans un cadre international de conservation des ressources génétiques de la canne à sucre.

## Des empreintes génétiques pour les variétés de canne à sucre

La révélation du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN (on considère ici l'ADN du noyau et non l'ADN du cytoplasme) comporte plusieurs étapes :

- l'extraction de l'ADN ;
- la digestion de l'ADN, c'est-à-dire sa coupure en des sites bien déterminés au moyen d'enzymes dites « de restriction », qui provoque la formation de fragments de longueurs diverses ;
- la séparation des fragments par électrophorèse en gel d'agarose, en fonction de leur longueur ;
- le transfert sur une membrane en nylon des fragments ainsi séparés ;
- « l'hybridation » moléculaire avec une séquence d'ADN particulière, dite « sonde » (préalablement marquée, au phosphore 32 par exemple) : parmi les fragments présents sur la membrane, la sonde va reconnaître ceux qui contiennent une séquence qui lui est similaire et se fixer sur eux ;
- la révélation des fragments reconnus, par la mise en contact de la membrane avec un film autoradiographique qui sera imprimé par la radioactivité de la sonde.

Ainsi, chaque clone est caractérisé par un ensemble de bandes qui constitue son empreinte génétique (photo). On dispose de très nombreuses sondes. L'utilisation de cinq sondes seulement permettrait de distinguer plus de 10 000 variétés prises au hasard.



Profils de bandes obtenus pour 15 variétés de canne à sucre, dont l'ADN a été coupé avec l'enzyme de restriction Hind III, séparé par électrophorèse, puis hybridé avec la sonde UMC39. Cliché J.-C. Glaszmann



# Fiche de sevrage de vitroplants de canne à sucre

## Conditionnement des vitroplants

Les vitroplants sont conditionnés sur un milieu d'enracinement en tubes de plastique stériles et scellés. Repiqués, ils sont maintenus trois à quatre semaines à une température de 25 à 30 °C avant l'envoi.

## Passage hors des conditions stériles

Possible lorsque les vitroplants enracinés ont 5 à 6 racines de 2 à 3 centimètres. Desceller les tubes, extraire les plantes délicatement, rincer les racines à l'eau, couper les feuilles pour limiter l'évaporation et pour stimuler le démarrage des bourgeons.

## Traitement fongicide

Tremper les plants dans du Benlate à 1 gramme par litre de produit commercial ou de l'Aliette à 1 gramme par litre.



Trempage des plants dans la solution fongicide.

## Le repiquage des plants

Sevrage des vitroplants en Jiffy 7 (pastilles de tourbe compressée). Faire d'abord gonfler les Jiffy 7 pendant 10 minutes avec la solution fongicide utilisée précédemment. Faire un trou à la surface du Jiffy 7 et y glisser les racines. Reboucher et tasser la tourbe autour du plant.



Repiquage des plants en Jiffy 7.



Vitroplants enracinés, prêts à être sevrés.

## Les conditions de sevrage

Placer les plants sevrés à l'abri du vent et du soleil. Limiter le dessèchement en recouvrant les Jiffy 7 de plastique transparent, jusqu'à l'émission de deux ou trois nouvelles feuilles. En cas de dessèchement, brumiser un peu d'eau. Entretenir par des arrosages quotidiens, puis compléter deux à trois semaines plus tard avec une solution de type engrais foliaire (exemple : Mairol, 2 grammes par litre de produit commercial). Contrôler les attaques fongiques par des pulvérisations de Bayleton 5 à raison de 1 gramme par litre de produit commercial, une fois par semaine.

## Le passage au champ

Possible au bout de quatre à six semaines si la croissance est vigoureuse. Tremper le Jiffy 7 avec son plant dans du Bayleton à 1 gramme par litre, préparer le terrain, ménager un trou pour placer le Jiffy 7. Prendre soin de ne pas briser la motte et de ne pas abîmer les racines. Mettre directement en terre les Jiffy 7. Couper légèrement les feuilles pour limiter



Plants en Jiffy 7 sous mini-serre.



Plants en serre, âgés de 6 à 8 semaines, en attente de plantation.

le dessèchement. Si au bout de six semaines en Jiffy 7, les plants ne sont pas suffisamment vigoureux, les placer en pots, offrant plus de substrat que les Jiffy 7 épuisées. Traiter avec un insecticide systémique (Curater).

Effectuer le passage au champ lorsque la température du sol est supérieure à 18 °C. Une humidité de l'air élevée est souhaitable, il est conseillé de brumiser un peu, même en présence d'irrigation.



Le passage au champ.



# Variétés de canne à sucre conservées en vitrothèque

Laboratoire de culture *in vitro*,  
CIRAD-CA, BP 5035,  
34032 Montpellier Cedex 1, France.

## 187 variétés en libre accès

B37172	Co312	CP52-43	CP72-356	L60-25	Phil56226	RB705007	Tuc68-18
B4362	Co331	CP52-48	CP72-370	L62-96	Phil58260	RB705146	Tuc68-19
B46364	Co419	CP57-603	CP72-1312	L65-69	Phil6553	RB705375	Tuc69-117
B47258	Co421	CP59-73	CP73-351	L66-97	Phil6559	RB735220	Tuc71-5
B49119	Co449	CP60-01	CP73-1547	L72-85	Phil6607	RB735275	Tuc72-16
B51129	Co462	CP62-258	CP74-383	LF63-863	POJ2878	RB748022	Tuc72-23
B52107	Co527	CP63-306	CP74-2005	LF66-2918	PR1007	RD7410	Tuc74-1
B60125	Co740	CP63-588	CP77-414	M31/45	PR1016	RP148-70	Tuc74-6
B63118	Co775	CP65-357	CRA6026	M569/69	PR61632	S17	Tuc74-10
B63119	Co785	CP66-315	EAK7076	N11	R397	SIP58-136	Tuc74-24
B64277	Co842	CP66-346	FR80234	N12	R469	SP70-1005	Tuc74-26
C334-64	Co1001	CP67-412	FR80236	N14	R472	SP70-1078	Tuc74-34
C323-68	Co1148	CP67-413	FR80412	N15	R526	SP70-1081	Tuc74-46
CB36-24	Co1157	CP670	IAC4865	N16	R566	SP70-1284	Tuc75-1
CB40-13	Co1177	CP68-350	IAC51205	N17	R567	SP70-1423	Tuc75-2
CB41-76	Co1202	CP68-1022	IAC52150	N18	R568	SP70-1478	Tuc75-3
CB45-155	Co1230	CP68-1026	IAC58480	N19	R570	SP70-3225	UCW5465
CB46-47	Co62175	CP68-1067	IAC64257	N52219	R572	SP70-3370	WI82777
CB47-15	Co6304	CP68-1154	Ja59-03	N53216	R70367	SP71-799	
CB47-355	Co6415	CP69-1059	Ja64-11	NA56-79	R7417	SP71-6163	
CB49-260	Co6806	CP70-1133	Ja64-15	NCo310	R75631	SP72-4928	
CB53-98	CoS443	CP72-353	Ja64-20	NCo334	RB7096	SP75-179	
CB56-126	CoS510	CP72-355	KWT57-423	NCo376	RB70194	Tuc67-27	

## 176 variétés disponibles dont l'emploi est restreint à des fins génétiques, avec autorisation de l'obteneur

B6504	B7695	B7882	B79118	H56-278	M657/66	MY64-26	Q126
B6623	B76102	B78130	B79130	H56-4848	M3035/66	NI1	Q127
B69379	B76113	B78178	B79226	H57-5174	M695/69	NIF3	Q129
B69566	B76132	B78224	B8007	H59-3775	MEX64-1214	NIN2	Q130
B69758	B76146	B78237	B8008	H62-4671	MEX65-1424	Q75	Q134
B70442	B76181	B78242	B8066	H65-7052	MEX66-1247	Q84	Q135
B70462	B76196	B78244	B8093	H66-4927	MEX68-200	Q90	Q137
B70482	B76247	B78245	B80276	H68-1158	MEX69-290	Q95	Q138
B70520	B76398	B78249	B80361	H68-2235	MEX70-485	Q96	RK65-37
B70531	B7784	B78266	B80689	H69-8235	Mol45-03	Q102	SES14
B70532	B7795	B78299	BJ7013	H69-9103	MQ72-1175	Q103	SES231
B72191	B77123	B78358	F146	H70-144	MQ72-4005	Q108	US56-15-8
B74254	B77126	B78360	F151	H72-8597	MQ72-5006	Q109	Galoa
B74359	B77392	B78366	F156	H73-6110	MQ72-5089	Q110	Kaba
B74477	B77415	B78436	F160	H75-8776	MQ76-23	Q111	Mali
B75300	B77565	B78482	F161	H77-6694	MQ76-53	Q113	Mana
B75412	B77639	B78560	F167	H78-7234	MY53-53	Q114	Ono
B75519	B77740	B78604	F175	HJ57-41	MY53-173	Q115	Tabongo
B75524	B7802	B78628	F176	M574/62	MY54-62	Q117	Triton
B75527	B7814	B78697	F178	M237/62	MY54-129	Q120	Trojan
B75532	B7852	B78700	H37-1933	M2173/63	MY55-14	Q121	Uba Naguin
B7639	B7877	B7997	H50-7209	M376/64	MY57-15	Q124	

## Bibliographie

BAUDIN P., 1984. Quarantaine de canne à sucre à Montpellier, France. *L'Agronomie Tropicale*, 39 (3) : 262-267.

DEREUDDRE J., 1994. Un outil pour la conservation des ressources génétiques. *Biofutur*, 132 : 39-41.

FELDMANN P., ROTT P., 1991. Un exemple d'application des techniques de culture *in vitro* en Guadeloupe : la propagation de vitroplants sains destinés aux pépinières de canne à sucre. Première rencontre internationale en langue française sur la canne à sucre, 10-15 juin 1991, Nogent sur Marne, France. AFCAS, Paris, France, p. 121-123.

GONZALEZ ARNAO M. T., ENGELMANN F., HUET C., URRAS C., 1993. Cryoconservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing rate and histology. *Cryo-Letters*, 14:303-308.

MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco medium culture. *Physiol. Plant*, 15:473-497.

PAULET F., ACQUAVIVA C., EKSO-TRAMAGE T., LU Y.H., D'HONT A., GLASZMANN J.-C., 1991. La vitrotèque ou conservation d'une collection de canne à sucre *in vitro*. Première rencontre internationale en langue française sur la canne à sucre, 10-15 juin 1991, Nogent sur Marne, France. AFCAS, Paris, France, p. 49-52.

PAULET F., ENGELMAN F., GLASZMANN J.-C., 1993. Cryoconservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/deshydratation. *Plant cells reports*, 12:525-529.

ROCCA W.M., CHAVEZ R., MARTIN M.L., ARIAS D.I. MAFLA G., REYES R., 1989. *In vitro* methods of germplasm conservation. *Genome*, 31:813-817.

SAUVAIRE D., GALZY R., 1987. Multiplication végétative de la canne à sucre (*Saccharum* sp.) par bouturage *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.*, 278 D : 467-470.

■ F. PAULET, J.-C. GLASZMANN — **Les biotechnologies en soutien à la diffusion variétale chez la canne à sucre.**

**Résumé** Diffusion et échanges variétaux chez la canne à sucre bénéficient aujourd'hui des progrès en biotechnologie. En complément du service de « quarantaine internationale » organisé par le CIRAD à Montpellier, il a été entrepris de constituer une collection de canne à sucre *in vitro*. La régénération *in vitro* de bourgeons axillaires et la conservation en vie ralentie des plantules obtenues ont été mises au point. Près de 400 variétés (ou clones) sont maintenant stockées à raison de 10 échantillons chacune. Cette « vitrotèque » occupe un espace réduit et permet de fournir rapidement des plants sains pour une large gamme de matériel. Cette forme *in vitro* rend possible également l'application de la cryoconservation, utile pour la préservation des ressources génétiques. Le recours à l'électrophorèse d'enzymes et aux nouveaux outils de la biologie moléculaire (RFLP) vient renforcer le contrôle et la fiabilité de la collection.

Mots-clés : *Saccharum*, canne à sucre, clone, culture *in vitro*, biologie moléculaire, électrophorèse enzymatique, cryoconservation, vitrotèque, quarantaine.

■ F. PAULET, J.-C. GLASZMANN — **Las biotecnologías como ayuda a la difusión de variedades de caña de azúcar.**

**Resumen** La difusión y los intercambios de variedades de caña de azúcar sacan provecho hoy de los progresos realizados en biotecnología. Como complemento del servicio de "cuarentena internacional" organizado por el CIRAD en Montpellier, se ha emprendido la constitución de una colección de caña de azúcar *in vitro*. Se ha llevado a cabo la regeneración *in vitro* de yemas axilares y la conservación en letargo de las plántulas obtenidas. Actualmente se tienen almacenadas cerca de 400 variedades (o clones), con 10 muestras por variedad. Esta "vitroteca" ocupa un espacio reducido y permite suministrar rápidamente plantas sanas para una amplia gama de material. Esta forma *in vitro* también posibilita la aplicación de la criocconservación, que es útil para la preservación de recursos genéticos. La utilización de la electroforesis de enzimas y de las nuevas herramientas de la biología molecular (RFLP) refuerza el control y la fiabilidad de la colección.

Mots-clés : *Saccharum*, caña de azúcar, clon, cultivo *in vitro*, biología molecular, electroforesis enzimática, criocconservación, vitroteca, cuarentena.

■ F. PAULET, J.-C. GLASZMANN — **Biotechnological support for varietal extension of sugarcane.**

**Abstract** Biotechnological advances have benefitted sugarcane varietal extension and exchange. An *in vitro* sugarcane collection has now been set up as a supplement to the "International Quarantine Service" organized by CIRAD in Montpellier (France). *In vitro* sucker regeneration and latency conservation of the resulting plantlets has been developed. Almost 400 varieties or clones (10 specimens of each) have now been stored. This "vitrotèque" does not take much space and enables distribution of a broad range of healthy plants rapidly. This *in vitro* plant material can also be cryopreserved, a useful procedure for genetic resource conservation. Enzyme electrophoresis and other molecular biology tools (RFPL) are used to control the collection, thus quaranteeing its reliability.

Key words: *Saccharum*, sugarcane, clon, *in vitro* culture, molecular biology, enzyme electrophoresis, cryopreservation, vitrotèque, quarantine.