

PERÚ

Ministerio de
Agricultura y Riego

Instituto Nacional
de Innovación Agraria

Estación Experimental
Agraria "El Porvenir - San Martín"

MANUAL PROTOCOLOS PARA EL CULTIVO IN VITRO DE PIÑÓN BLANCO (*Jatropha curcas* L.)



MINISTERIO
DE AGRICULTURA
Y RIEGO



INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA

Henri Delgado Haya

**LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL DE LA ESTACIÓN
EXPERIMENTAL AGRARIA “EL PORVENIR - San Martín”**

Gobierno Regional de San Martín

Proyecto Desarrollo de Ecotipos a través de la Investigación del Cultivo de Piñón blanco (*Jatropha curcas* L.) en la Región San Martín
www.regionsanmartin.gob.pe

AUTOR

Henri Delgado Haya, Investigador del Proyecto Piñón,
Convenio INIA–GORESAM.

Instituto Nacional de Innovación Agraria, Estación Experimental Agraria “El Porvenir San Martín”, Carretera Fernando Belaunde Terry Km. 13.2 – Juan Guerra, Jr. Martínez de Compañón N° 1035 Telefax (042) 522291 – Tarapoto – www.inia.gob.pe – Email: elporvenir@inia.gob.pe

Impresión

Imprenta Vargas
Jr. Serafín Filomeno 392 - A - Moyobamba
Primera Edición: Octubre del 2013

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2013 - 15567

AGRADECIMIENTOS

El grupo de trabajo de investigaciones del Proyecto “Desarrollo de Ecotipos a través de la Investigación del Cultivo de Piñón Blanco (*Jatropha curcas* L.) en la Región San Martín”, es financiado por el Gobierno Regional de San Martín.

ÍNDICE

APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN LA PROPAGACIÓN DE PIÑÓN BLANCO	1
LISTA DE LOS MATERIALES Y EQUIPAMIENTO NECESARIOS	2
Equipos	2
Materiales y accesorios	2
PROTOCOS	4
Condiciones de cultivo	
1. Protocolo simplificado para la colección y esterilización superficial de segmentos nodales y/o foliares provenientes de invernadero o campo cercanos al sitio de Disección	4
2. Protocolo de Disección del Material Vegetal	5
Inducción y Mantenimiento	6
Para el caso de segmentos Nodales	6
Para el caso de explantes foliares	6
Enraizamiento	7
Formulaciones de soluciones Stock para el Medio de Cultivo	8
Composición del Medio de Inducción de Brotes a partir de Segmentos Nodales	9
Composición del Medio de Inducción de Brotes a partir de Explantes Foliares	10
Composición del Medio de Elongamiento y Multiplicación de Brotes	11
Composición del Medio de Enraizamiento de Brotes	12
3. Protocolo de preparación de Medios de Cultivo	13
4. Protocolo de Aclimatación de Plantulas de <i>Jatropha curcas</i> L.	
Producidas In Vitro	14
Bibliografía consultada	15
ANEXOS	16

APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN LA PROPAGACIÓN DE PIÑÓN BLANCO

Jatropha curcas L. es un arbusto perenne originario de América latina y extendida en todas las regiones tropicales del mundo. *Jatropha* es un género que comprende más de 170 especies. Siendo muchas de ellas ornamentales excepto *J. curcas* y *J. glandulifera*, estas son especies de alto rendimiento de aceite (Swarup 2004). Las semillas de *Jatropha* contienen 30–40% de aceite con un perfil de ácidos grasos similar al de los alimentos (Gubitz et al. 1999).

Por otro lado, *J. curcas* es una atractiva planta tropical fuente de energía. El aceite de las semillas es usada para los motores diesel, porque tiene características de los combustibles fósiles. *J. curcas* en campo produce de 6–8 TM/Ha con aproximadamente 37% de aceite.

El cultivo de *J. curcas* asume un rol importante para la producción a gran escala y la satisfacción de la demanda con material elite. En forma tradicional es posible la propagación a través de puntas de tallo, pero los bajos rendimientos y el establecimiento de plantas en suelos marginales hacen imposible este método de propagación.

El uso de métodos biotecnológicos posibilita la introducción de rasgos deseables en *Jatropha* para cubrir las demandas actuales. Se ha investigado un número de sistemas de propagación relacionados. Elegimos alguno de estos métodos para complementar nuestro libro de protocolos detallado, todos los trucos sutiles han sido desarrollados en nuestro grupo. Todos los métodos deben ser considerados cuando progresa el trabajo. Continuaremos actualizando este manual con nuevos métodos que demuestren ser más eficientes.

Aunque los resultados de campo e invernaderos son muy prometedores, el uso de plantas producidas a gran escala todavía debe ser evaluado en diferentes entornos y genotipos variados.

Para el año 2013, esperamos desarrollar protocolos de producción masiva utilizando bioreactores, esto nos permitirá la multiplicación masiva de plántulas con genotipo deseado.

H. Delgado H.

LISTA DE LOS MATERIALES Y EQUIPAMIENTO NECESARIOS

EQUIPOS

- Autoclave, 121°C, 15 lb / in² (1.06 kg / cm²)
- Esterilizador de herramientas de disección
- Equipo de aire acondicionado para control de temperatura en ambiente de incubación
- Sistema de iluminación con control automático de fotoperiodo
- Cámara de flujo laminar de aire estéril 99.99% eficiencia
- Potenciómetro
- Refrigerador para almacenamiento de químicos y soluciones stock
- Balanza analítica de precisión
- Agitador magnético
- Agitador orbital
- Microscopio binocular
- Estereomicroscopio
- Ozonizador portátil de ambientes
- Dispensador de líquidos de 5-100 ml
- Destilador de agua de 4 L/h
- Horno microondas
- Estufa eléctrica

MATERIALES Y ACCESORIOS

- Contenedores apropiados para preparar medios de cultivo
- Soluciones stock de 1N NaOH, 1N KOH, HCl
- Etanol al 95% y 70% preparado con agua estéril
- Pinzas y escalpelos con hojas reemplazables (#11)
- Papel aluminio en cuadros
- Algodón medicinal estéril en cuadros
- Botellas y frascos de vidrio de 1 y 2 litros
- Placas petri de vidrio estériles
- Probetas graduadas
- Agua destilada estéril

- Papel estéril para disección de explantes
- Cinta plástica para sellar placas petri con los cultivos
- Pipetores y set de pipetas
- Espátulas
- Contenedores estériles de vidrio o plástico para cultivo de tejidos
- Tubos de ensayo (50 ml), estériles
- Potes de pesado

PROTOCOLOS

CONDICIONES DE CULTIVO GENERALES

Las condiciones de cultivo requeridas en el ambiente de incubación son: 25-30 °C, luz blanca de fluorescentes con una intensidad de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad).

1. PROTOCOLO SIMPLIFICADO PARA LA COLECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODALES Y/O FOLIARES PROVENIENTES DE INVERNADERO O CAMPO CERCANOS AL SITIO DE DISECCIÓN.

1. Colecta de segmentos nodales y/o hojas inmaduras en contenedor limpio conteniendo papel toalla empapada en agua fría. La cosecha de los brotes vegetativos debe realizarse en horas de la mañana, entre las 8 y 9 a.m. Observe y evalúe el crecimiento y desarrollo de los brotes vegetativos luego de la poda en arboles individuales de genotipo selecto. Brotes vegetativos de 20-30 cm con yemas laterales de 1-3 mm son ideales para la colecta.



2. En laboratorio prepare una solución de agua destilada más detergente, disuelva el detergente y sumerja el material vegetal colectado por 10 minutos, enjuague cuatro veces con agua destilada.
3. Prepare una solución de etanol al 70% y sumerja los brotes vegetativos y/o foliares por tres segundos, retirar y colocar sobre papel toalla estéril.
4. Prepare una solución de 1% de NaOCl (lejía - 5.0% hipoclorito de sodio) usando agua autoclavada estéril contenida en plástico o vidrio. Ejemplo: Tomar 20 ml de blanqueador y disolver en 80 ml de agua destilada estéril agregar dos gotas de twenn 80 por cada 100 ml de solución.

Realizar esta operación en el interior de la cámara de flujo laminar.

Sumergir los brotes vegetativos por 20 minutos, enjuagar cuatro veces con agua destilada estéril.

5. Prepare una solución de 0.5% de NaOCl (lejía - 5.0% hipoclorito de sodio) usando agua autoclavada estéril contenida en plástico o vidrio. Ejemplo: Tomar 10 ml de blanqueador y disolver en 90 ml de agua destilada estéril agregar dos gotas de twenn 80 por cada 100 ml de solución.

Realizar esta operación en el interior de la cámara de flujo laminar.

Sumergir las hojas inmaduras por 15 minutos, enjuagar cuatro veces con agua destilada estéril.

6. Antes de la disección del material vegetal, drenar toda el agua de enjuague con el fin de disminuir el riesgo de contaminación.

También se puede extraer explantes (segmentos nodales y/o foliares) de plantas in vitro las misma que pueden ser obtenidas a partir de embriones zigóticos, en este caso coleccionar las semillas en estadio R3, R4 ó R5 (Garay, 2010); en este caso realizar la desinfección luego de retirar la testa de la semilla, hidratar por 3 horas en agua destilada estéril y en cámara de flujo, extraer el embrión.

2.- PROTOCOLO DE DIRECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Para el caso de segmentos nodales:

1. Una vez enjuagados correctamente, colocar los brotes vegetativos en una placa Petri o sobre papel filtro estéril.
2. Con ayuda de una pinza estéril sujetar el brote, y con ayuda de una hoja de bisturí seccionar los segmentos nodales de tal manera que quede 0.5 cm de entrenudo por arriba y debajo del nudo, así mismo cortar el peciolo lateral lo más cerca posible al punto de inserción en el brote.
3. Realizar el corte con un movimiento de adelante hacia atrás con el objeto de no aplastar el tejido circundante a la zona de corte.
4. Sembrar 01 segmento nodal por tubo de ensayo, insertando el segmento nodal en el medio de cultivo hasta la altura de la yema lateral.

Para el caso de explantes foliares:

1. Una vez enjuagados correctamente, colocar las hojas dentro de la placa estéril conteniendo papel filtro o toalla estéril.
2. Con ayuda de una pinza estéril sujetar el explante (sin presionar demasiado) y con ayuda de una hoja de bisturí separar el limbo del peciolo, seccionando el limbo en trozos de 0.5 mm.

3. Sembrar un peciolo por tubo de ensayo ó un segmento foliar por tubo de ensayo; en ambos casos colocar al explante en la superficie del medio de cultivo.

INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO

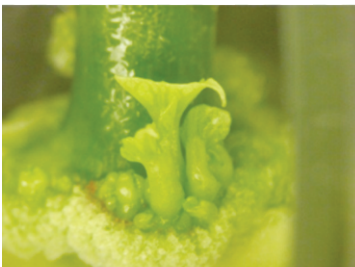
Para el caso de segmentos nodales:

1. Realizar la primera transferencia 20 días a medio de inducción fresco, realizar esto hasta observar que la yema lateral tiene como mínimo dos hojas.
- 2.- Transferir las plántulas a medio de mantenimiento hasta alcanzar plántulas de 3 cm de longitud como mínimo.



Para el caso de explantes foliares:

1. Realizar transferencias a medio de inducción fresco, cada 20 días; hasta observar brotes de 0.5-1 cm de longitud.
2. Separar los brotes que tengan 0.5 – 1.0 cm de longitud
3. Transferir las plántulas a medio de mantenimiento (cada 20 días) sin reguladores hasta que alcancen 3 cm de longitud.



ENRAIZAMIENTO

1. Plántulas de 3 cm, se transfieren a medio de enraizamiento, previo a esto eliminar hojas secas y cortar callo basal, insertar la parte basal del tallo en el medio de cultivo.
2. Una vez formadas las raíces, trasladar los frascos con la plántulas a un ambiente (de preferencia el vivero donde se aclimataran) con intensidad luminosa similar a las condiciones ambientales.
3. Luego de 35 días y una vez enraizadas las plántulas, iniciar el proceso de aclimatación de acuerdo al protocolo establecido.



FORMULACIÓN DE SOLUCIONES STOCK PARA EL MEDIO DE CULTIVO M&S (1962)

ITEM	Stock	Producto	Fórmula	Concentrac. Stock		Vol de Stock a preparar (mL)	Pesar		Preparación	Concentración final en medio de cultivo (g/L)
				Cant.	Unid.		Cantidad	Unid.		
Macro y micro nutrientes										
1	Stock A	Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	82.50	g/L	1000.00	82.5000	g	Disolver en agua destilada y enraizar a 250 mL. CORROSIVO , no pesar en papel aluminio.	1.6500
2	Stock B	Nitrato de Potasio	KNO ₃	95.00	g/L	1000.00	95.0000	g	Disolver en agua destilada y enraizar a 250 mL.	1.9000
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	88.00	g/L	1000.00	88.0000	g	Disolver en agua destilada y enraizar a 200 mL.	0.4400
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	KH ₂ PO ₄	34.00	g/L	1000.00	34.0000	g	Disolver en agua destilada y enraizar a 200 mL.	0.1700
						1000.00				
5	Stock E	Microelementos				1000.00			Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado.	
		Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0500	g/L		0.0001	g	1. Pesar 0.1g y disolver en 100ml H ₂ O 2. Tomar 10 ml de esta solución	0.0003
									3. Disolverlos en 200ml del stock E	
									4. Descartar los 90 ml restantes	
		Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0050	g/L		0.0000	g	1. Pesar 0.1g y disolver en 100ml H ₂ O 2. Tomar 1 ml de esta solución	0.000025
									3. Disolver en 200ml del stock E	
									4. Descartar los 99 ml restantes	
		Ioduro de Potasio	KI	0.1660	g/L		0.0002	g	Disolver con H ₂ O directamente en frasco de	0.0008
		Acido Borico	H ₃ BO ₃	1.2300	g/L		0.0012	g	Disolver con H ₂ O directamente en el frasco de CORROSIVO , disolver inmediatamente.	0.0062
									PELIGROSO al contacto con la Piel	
6	Stock F	Solución de sulfatos				1000.00			Stock compuesto por varios reactivos que primero deben prepararse por separado	
		Sulfato de Manganeso Monohidratado	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.3800	g/L		0.0034	g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de	0.0169
		Sulfato de Magnesio Heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74.0000	g/L		0.0740	g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de	0.3700
		Sulfato de Zinc Heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.7250	g/L		0.0017	g	Disolver en H ₂ O directamente en el frasco de	0.0086
		Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0050	g/L		0.0000	g	1. Pesar 0.1g y disolver en 100ml H ₂ O 2. Tomar 1 ml de esta solución	0.0000
									3. Disolver en 200ml del stock	
									4. Descartar los 99 ml restantes	
7	Stock G	Agente quelante	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.8650	g/L	1000.00	0.0019	g	1. Disolver el EDTA en 200 mL de agua destilada, esperar 20 min.	0.0373
		Sulfato ferroso hepta hidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.3900	g/L		0.0014	g	2. Calentar la solución hasta antes de hervir.	0.0278
									3. Agregar el FeSO ₄ lentamente hasta obtiene una solución amarillo claro	
									4. Almacenar en frasco oscuro y en refrigeración (4°C)	

**COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE INDUCCIÓN DE BROTES
A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES**

ITEM	Stock	Producto	Cantidad de Stock/L	
			Cant.	Unid
Macro y micro nutrientes				
1	Stock A	Nitrato de Amonio	20.00	mL
2	Stock B	Nitrato de Potasio	20.00	mL
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	5.00	mL
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	5.00	mL
5	Stock E	Molibdato de sodio	5.00	mL
6	Stock F	Sulfato de Manganeso Monohidrato	5.00	mL
7	Stock G	Agente quelante	20.00	mL
Vitaminas				
8		Tiamina - HCl	0.40	mL
9		Acido Nicotinico	0.50	mL
Fuentes de carbono				
10	Sucrosa	Sacarosa o sucrosa	30.00	g
Fitoreguladores				
11	BAP	benzylaminopurine	1	mg
12	KIN	kinetina	1	mg
Agentes gelantes o solidificantes				
	Agar	Phytigel	2.50	g
		pH:	5.8	

**COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE INDUCCIÓN DE BROTES
A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES**

ITEM	Stock	Producto	Cantidad de Stock/L	
			Cant.	Unid
Macro y micro nutrientes				
1	Stock A	Nitrato de Amonio	20.00	mL
2	Stock B	Nitrato de Potasio	20.00	mL
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	5.00	mL
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	5.00	mL
5	Stock E	Molibdato de sodio	5.00	mL
6	Stock F	Sulfato de Manganeso Monohidrato	5.00	mL
7	Stock G	Agente quelante	20.00	mL
Vitaminas				
8		Tiamina - HCl	0.40	mL
9		Acido Nicotinico	0.50	mL
Fuentes de carbono				
10		Sacarosa o sucrosa	30.00	g
Fitoreguladores				
11	TDZ	thidiazuron	9.08	µM
Agentes gelantes o solidificantes				
12		Phytigel	2.50	g
		pH:	5.8	

**COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE ELONGAMIENTO Y
MULTIPLICACIÓN DE BROTES**

ITEM	Stock	Producto	Cantidad de Stock/L	
			Cant.	Unid
Macro y micro nutrientes				
1	Stock A	Nitrato de Amonio	20.00	mL
2	Stock B	Nitrato de Potasio	20.00	mL
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	5.00	mL
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	5.00	mL
5	Stock E	Molibdato de sodio	5.00	mL
6	Stock F	Sulfato de Manganeso Monohidrato	5.00	mL
7	Stock G	Agente quelante	20.00	mL
Vitaminas				
8		Tiamina - HCl	0.40	mL
9		Acido Nicotínico	0.50	mL
Fuentes de carbono				
10		Sacarosa o sucrosa	30.00	g
Fitoreguladores				
11	BAP	benzylaminopurine	1.00	mg
12	AIA	indole-3-acetic acid	0.50	mg
Agentes gelantes o solidificantes				
13		Phytigel	2.50	g
		pH:	5.8	

**COMPOSICION DEL MEDIO DE ENRAIZAMIENTO
DE BROTES**

ITEM	Stock	Producto	Cantidad de Stock/L	
			Cant.	Unid
Macro y micro nutrientes				
1	Stock A	Nitrato de Amonio	20.00	mL
2	Stock B	Nitrato de Potasio	20.00	mL
3	Stock C	Cloruro de Calcio dihidratado	5.00	mL
4	Stock D	Fosfato de Potasio monobasico	5.00	mL
5	Stock E	Molibdato de sodio	5.00	mL
6	Stock F	Sulfato de Manganeso Monohidrato	5.00	mL
7	Stock G	Agente quelante	20.00	mL
Vitaminas				
8		Tiamina - HCl	0.40	mL
9		Acido Nicotinico	0.50	mL
Fuentes de carbono				
10		Sacarosa o sucrosa	30.00	g
Fitoreguladores				
11	IBA	indole-3-butyric acid	0.10	mg
Agentes gelantes o solidificantes				
12		Phytigel	2.50	g
		pH:	5.8	

3.- PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1. En un vaso precipitado de 1 L colocar 600 ml de agua destilada estéril.
2. Agregar las soluciones stock de sales minerales.
3. Agregar los suplementos vitamínicos y azúcares.
4. Enrazar a 1 L con agua destilada estéril y agitar con ayuda de una espátula.
5. Calibrar el potenciómetro y proceder a medir el pH; ubicar al mismo en el rango de 5,6 – 5.8 utilizando de soluciones de KOH 1N ó HCl 1N según corresponda.
6. Dispensar el medio de cultivo de acuerdo a la capacidad del recipiente, tapar el recipiente con tapa plástica o papel aluminio.
7. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos y a 1 atmósfera de presión.
8. Dejar enfriar a temperatura ambiente, para evitar la condensación y formación de una lámina de agua sobre la superficie del medio de cultivo.
9. Etiquetar convenientemente, indicando, composición, fecha de preparación y quien lo preparo.
10. Almacenar en refrigeración ó en ambiente libre de polvo; en algunos casos los medios de cultivo contienen sustancias sensibles a la luz, en este caso almacenar en oscuridad.

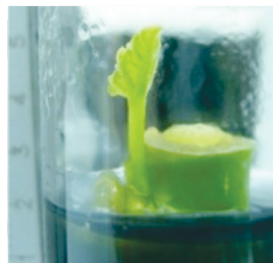
4. PROTOCOLO DE ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE *Jatropha curcas* L. PRODUCIDAS IN VITRO

1. Realizar esta etapa exclusivamente en ambientes de viveros, cercanos a los campos de cultivo, con acceso a vías de comunicación; el vivero deberá estar cubierto con malla 80%.
2. Extraer las plántulas enraizadas de los frascos que los contienen, tener cuidado de no romper raíces.
3. Eliminar hojas basales secas.
4. Lavar las raíces con agua corriente, para eliminar todos los restos del medio de cultivo adherido, tener cuidado de no romper las raíces.
5. Sumergir las plántulas lavadas en una solución de fungicida Benomyl (1 g/L) durante 30 minutos.
6. Preparar un sustrato 2:1 (tierra negra + arena lavada), esterilizar el mismo por solarización.
7. Colocar el sustrato en bolsas almacigueras de 1 kg y colocar una plántula en el centro de la bolsa, presionar el sustrato para eliminar bolsas de aire.
8. Cubrir la bolsa con una bolsa almaciguera por 20 días (para evitar deshidratación de las plántulas).
9. Durante este proceso aplicar fertilizante NPn 11-8-6 (en el agua de riego) cada 3 días.
10. En los últimos 10 días incrementar la iluminación a 50% antes de trasladar las plantas a campo definitivo.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

- Ajay C. Deore & T. Sudhakar Johnson. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnol Rep* (2008) 2:7–11
- CARDOSO DA SILVA. 2010. Propagação vegetativa de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Fundação Universidade Federal do Tocantins campus universitário de Gurupi mestrado em produção vegetal.
- CASSOL TAGLIANI. 2010. Uso De Ácido Indol Butírico Na Miniestaquia De Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.). IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa.
- GARAY. R. 2010. Determinación momento óptimo de cosecha de frutos de *Jatropha curcas* L. Proyecto FINCYT-INIA/EEA EL PORVENIR.
- Manjari Datta y colaboradores. 2007. In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.), publicado en *CURRENT SCIENCE*, VOL. 93, NO. 10, 25 NOVEMBER 2007.
- PIERIK. R.L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi Prensa. Madrid.

ANEXOS
Proceso de propagación in vitro



**Imágenes de brotes vegetativos a 31 días de
instalado el ensayo:**





INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA



MINISTERIO
DE AGRICULTURA
Y RIEGO



perú
sanmartín
Gobierno Regional
regiónverde



INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA