

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA MEDIANTE MARCADORES RAPD EN PLANTAS DE *Ipomoea batatas*

O. González[✉], Arais Fernández, Yomary Fraga, Belkis Pino, María M. Hernández y J. J. Silva

ABSTRACT. Donating plants coming from tuberous root sprouts, belonging to a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) clone, INIVIT B 93-1, were placed in flasks containing water under the semicontrolled conditions of a laboratory to induce bud break, as well as vitroplants coming from the somatic embryos of leaf limb calluses; in both cases, leaf limbs were used to perform the molecular studies of Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD), to identify the material and evaluate the genetic stability of plants obtained from somatic embryos. The total genomic DNA was extracted from the material mentioned before, through a homogeneous mixture of leaf limb tissue (1,0 g) and liquid nitrogen. DNA concentration was determined by means of spectrophotometry and materials were evaluated for 10 arbitrary primers, following Operon Technologies' protocol recommendations, which were: OPF-15, OPF-14, OPA-13, OPF-13, OPF-04, OPF-07, OPF-01, OPF-03, OPA-12 and OPF-05. PCR products were electrophoretically separated at 1.5 % agarose gel in a TBE buffer, and they were stained with etidium bromide before being observed on an UV transilluminator. The amplification patterns obtained were compared by evaluating bands, both for its presence (1) and absence (0) per each of the treatments, then observing a complete monomorphism in the donating material bands, compared to the one coming from somatic embryo vitroplants.

Key words: *Ipomoea batatas*, vitroplants, genetic stability, genetic markers

RESUMEN. Se emplearon plantas donantes provenientes de brotes de raíces tuberosas, pertenecientes al clón de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) INIVIT B 93-1, colocadas en frascos con agua en condiciones semicontroladas de laboratorio para inducir la brotación de las yemas, así como vitroplantas procedentes de embriones somáticos obtenidos a partir de callos de limbo foliar; en ambos casos, se emplearon los limbos foliares para realizar los estudios moleculares de ADN Polimórfico de Amplificación Aleatoria (RAPD) en la identificación del material y evaluar la estabilidad genética de las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos. Se extrajo el ADN genómico total al material vegetal antes mencionado, para lo cual se empleó una mezcla homogénea de tejido de limbo foliar (1,0 g) con nitrógeno líquido. La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría y los materiales se evaluaron para 10 cebadores arbitrarios, según las recomendaciones de los protocolos de la firma comercial *Operon Technologies*, que fueron: OPF-15, OPF-14, OPA-13, OPF-13, OPF-04, OPF-07, OPF-01, OPF-03, OPA-12 y OPF-05. Los productos de la amplificación (PCR) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, en solución amortiguadora TBE y se tiñeron con bromuro de etidio antes de ser visualizados en un transiluminador ultravioleta. La comparación de los patrones de amplificación obtenidos se realizó evaluando las bandas de forma binaria por su presencia (1) y ausencia (0) para cada uno de los tratamientos, donde se pudo observar un monomorfismo total en las bandas del material donante, en comparación con el procedente de vitroplantas de embriones somáticos.

Palabras clave: *Ipomoea batatas*, vitroplantas, estabilidad genética, marcadores genéticos

INTRODUCCIÓN

El boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) es ampliamente consumido en el mundo y la obtención de material de siembra mediante la micropropagación acelerada re-

presenta una alternativa para la producción de "semilla" de alta calidad (1); como este constituye el principal problema del cultivo, por la poca disponibilidad de material de siembra, se emplean las técnicas *in vitro* para resolver esta situación y favorecer su multiplicación.

Una vía de multiplicación acelerada de los cultivos es la embriogénesis somática, que representa hoy en día un gran avance en el cultivo de tejidos vegetales (2), y su aplicación promete ventajas, por su alto índice de multiplicación y empleo en los cultivos de interés agrícola (3), aunque no ha sido señalada en la actualidad para algunas especies (4), lo cual requiere de estudio y, unido a esto, al propagar o seleccionar una especie vegetal, se hace necesaria su identificación genética, para lo cual se

Dr.C. O. González y Dr.C. J. J. Silva, Profesores Asistentes del Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Apdo. 21, Bayamo, CP 85100, Granma; Dra.C. Arais Fernández, Yomary Fraga y Belkis Pino, Investigadoras del Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fitopatología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas; Dra.C. María M. Hernández, Investigadora Titular de Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1. San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700, Cuba

✉ ogpaneque@udg.co.cu

emplean los marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares (5). La identificación basada exclusivamente en marcadores morfológicos (6), aunque es la más tradicional y oficialmente aceptada, no es totalmente satisfactoria, debido a su lentitud; de ahí la necesidad del empleo de otros métodos más modernos y novedosos, para evaluar la estabilidad genética de las plantas regeneradas, entre los cuales se encuentran los citogenéticos (7), isoenzimáticos (8) y moleculares (9).

Los marcadores pueden ser empleados con éxito para buscar diferencias en los patrones de expresión entre cultivares, variedades y plantas, lo cual indica que los patrones son específicos para cada material genético, siendo una vía que confirma que el método puede ser usado para evaluar las variaciones genéticas en las plantas (10). Los estudios de estabilidad genética constituyen una técnica válida y rápida para la detección de la variabilidad, ya que son marcadores de expresión y permiten distinguir los genotipos y establecer las relaciones filogenéticas entre ellos (11, 12).

Por otra parte, las técnicas de los marcadores pueden ser empleadas para hacer más eficiente la obtención de nuevas variedades y su utilidad ha sido demostrada; no existe dudas de que serán usadas en los arbitrajes de propiedad intelectual en un futuro (13).

Al ser analizada la identificación de los genotipos, específicamente mediante RAPD, se puede plantear que ha sido posible su empleo en varias especies, debido a que cada selección o cultivar produce un patrón reproducible de bandas de ADN amplificado (14), todo lo cual permite expresar que aun cuando las técnicas moleculares han sido extremadamente útiles en la caracterización e identificación del germoplasma, esta tecnología debe usarse como complemento de las evaluaciones morfológicas y agronómicas del material en estudio (15).

El objetivo del presente trabajo es evaluar, mediante el uso de marcadores RAPD, la estabilidad genética de las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos, en comparación con el material donante procedente del clón de boniato INIVIT B 93-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon plantas donantes provenientes de raíces tuberosas pertenecientes al clón INIVIT B 93-1, cultivadas en parcelas experimentales de investigación, según el Instructivo técnico del boniato (16), trasladadas al laboratorio y colocadas en frascos con agua en condiciones semicontroladas, para inducir la brotación de las yemas, así como vitroplantas procedentes de embriones somáticos, obtenidos a partir de callos de limbos foliares de 1 cm² (17) y sembrados con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo (18); en ambos casos se tomaron los limbos foliares para realizar los análisis moleculares del ADN.

Con la finalidad de evaluar la utilización de la Técnica de Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD),

para estudiar la estabilidad del material propagado, se tomaron al azar muestras de tejido foliar de brotes de raíces tuberosas con 25 días y vitroplantas con 20 días de edad. Se extrajo el ADN genómico total, según el método descrito (19). La concentración de ADN de cada muestra fue determinada por espectrofotometría y se estimó la medición a la intensidad óptica de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro *Ultrasepec Plus Spectrophotometer Pharmacia LKB*. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25 uL que contenía: 10 mM Tris-HCL a pH 8,3; 50 mM KCL, 2 mM MgCL₂, 0,001 % de gelatina; 100 uM de cada dNTPs, 5 pmoles de los cebadores Kits OPA y OPF de la firma comercial *Operon Technologies* Alameda California, 5 ng de ADN genómico y 2 μ de taq ADN polimerasa (Amplicen).

Se usaron diez cebadores arbitrarios que fueron los siguientes: OPF-15, OPF-14, OPA-13, OPF-13, OPF-04, OPF-07, OPF-01, OPF-03, OPA-12 y OPF-05; los cuales han sido usados con anterioridad para este tipo de estudio en diferentes cultivos (20, 21).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca Techme de la firma comercial Progene y la reacción de amplificación se realizó durante 45 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 36°C, dos y 10 minutos a 72°C (20). Los productos de la amplificación, separados mediante electroforesis vertical en gel de agarosa al 1,5 % en solución amortiguadora de Tris-HCL ácido bórico EDTA (TBE) 0,5X a 110 volts, fueron teñidos con bromuro de etidio (5 mg.mL⁻¹) y visualizados en un transiluminador ultravioleta.

Se evaluaron las bandas existentes en el donante y el regenerante de forma binaria por su presencia (1) y ausencia (0), visualizándose a través de fotografías. Los resultados se expresaron en porcentajes de monomorfismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 10 cebadores ensayados, siete produjeron una amplificación aceptable en cuanto a la intensidad de bandas (OPF-15, OPF-14, OPF-04, OPF-07, OPF-01, OPA-12 y OPF-05) y los cebadores más informativos fueron OPF-01, OPA-12 y OPF-07, al generar el mayor número de bandas en el donante y las vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos (Tabla I), coincidiendo el total de bandas obtenidas para el donante y las vitroplantas con todos los cebadores empleados (Figura 1), existiendo un alto monomorfismo entre ambos materiales (100 %).

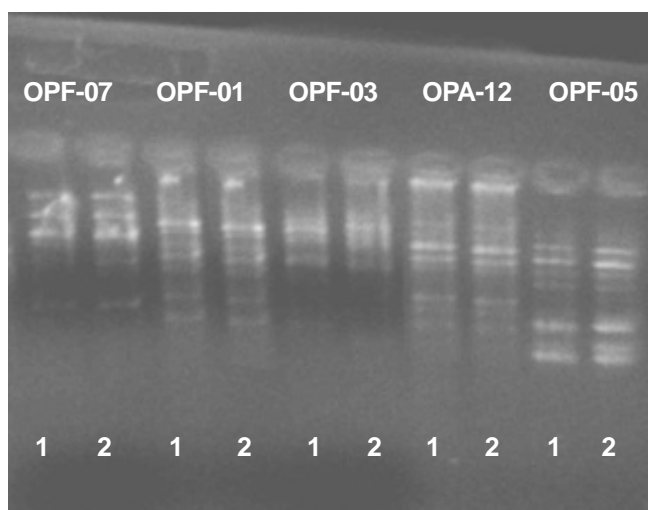
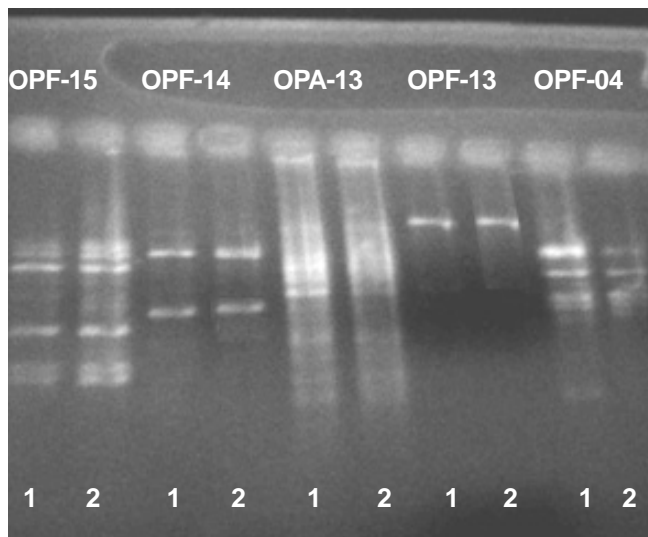
Referente al empleo de los marcadores moleculares, se ha planteado que son una herramienta eficaz para monitorear la estabilidad genética del material vegetal (5, 22) y, por otra parte, se ha dejado claro que estos brindan más información que los marcadores morfológicos, pues el polimorfismo detectado es mayor y no están influidos por el ambiente (23, 24).

Tabla I. Resultados del análisis de los RAPD en el material donante y el regenerado a partir de embriones somáticos en el clón INIVIT B 93-1

Cebador	Clón INIVIT B 93-1			Monomorfismo (%)
	Total de bandas (n) Donante	Regenerado	Bandas monomórficas	
OPF-15	4	4	4	100
OPF-14	2	2	2	100
OPA-13	5	5	5	100
OPF-13	1	1	1	100
OPF-04	3	3	3	100
OPF-07	5	5	5	100
OPF-01	6	6	6	100
OPF-03	2	2	2	100
OPA-12	6	6	6	100
OPF-05	6	6	6	100
---	40	40	40	100

1- Material donante

2- Vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos

**Figura 1. Productos de la amplificación por PCR del ADN en *Ipomoea batatas* perteneciente al clón INIVIT B 93-1**

Las isoenzimas y los RAPD han sido extensamente usados, para determinar la diversidad genética y relaciones entre especies (25, 26). En el cultivo del boniato, los estudios moleculares con RAPD han sido usados, específicamente en algunos cultivares para la estimación de la diversidad genética, en el mapeo genético de los clones de interés y la localización de genes en las raíces resistentes a nematodos (27), no existiendo información en lo referente a estudios llevados a cabo en el material propagado vía embriogénesis somática.

Al respecto, se ha planteado que los análisis de RAPD pueden ser empleados para la identificación de cultivares (28), así como para distinguir las diferencias entre los genotipos. Mientras que, por otro lado, en el cultivo de la yuca, al comparar plantas donantes con vitroplantas procedentes de embriones somáticos (29), se determinó, mediante el empleo de marcadores morfoagronómicos y moleculares (AFLP), que las plantas obtenidas de los embriones somáticos fueron genéticamente estables, lo que a su vez confirmó la posibilidad de emplear la embriogénesis somática, como una vía de micropropagación acelerada.

La funcionalidad de los cebadores empleados en este trabajo, para detectar variación genética, ha sido informada (20, 21) en estudios de diversidad genética en diferentes especies vegetales del género *Lycopersicon*, que demostraron que estos son efectivos para llevar a cabo dichos estudios y no han sido señalados con anterioridad para el cultivo del boniato, por lo que deberán probarse otros cebadores antes de hacer conclusivos los resultados de monomorfismo encontrados para el donante y las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos del clón INIVIT B 93-1.

Desde el punto de vista bioquímico y molecular, el cultivo del boniato ha sido poco investigado, aspecto que se hace necesario enfatizar, ya que la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales requiere como análisis complementarios los estudios de la estabilidad genética del material obtenido (30), a fin de conocer su comportamiento, luego de haber sido sometido a este proceso, representando los resultados la información de la aplicación de los análisis moleculares RAPD, en la determinación de la estabilidad genética de las plantas obtenidas vía embriogénesis somática en el boniato.

De manera general, puede plantearse que la amplificación del ADN de los materiales con los cebadores utilizados produjo un alto grado de monomorfismo, presentando las plantas procedentes de embriones somáticos patrones de bandas idénticos al donante en la región del ADN explorada por ellos.

Los estudios de los marcadores moleculares en el cultivo del boniato han sido muy limitados y más aún en la determinación de la estabilidad genética en plantas obtenidas a partir de embriones somáticos; de ahí, se puede plantear que los resultados de la presente investigación constituyen un aporte científico y, por primera vez en Cuba, se informa acerca de la aplicación de los RAPD en plantas propagadas a través de embriones somáticos en la especie *Ipomoea batatas*.

CONCLUSIONES

Las semejanzas observadas en el ADN genómico de las plantas donantes y las vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos evidenciaron que no se observó polimorfismo para los cebadores empleados, ya que estos no son específicos para detectar variabilidad en el cultivo del boniato y pueden no ser lo suficientemente específicos para detectar las diferencias entre los donantes y las plantas regeneradas.

RECOMENDACIONES

Estudiar otros cebadores y marcadores moleculares que exploren nuevas regiones del ADN, con vistas a tener una mayor información acerca de la estabilidad del material vegetal estudiado.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), especialmente al Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, que posibilitaron la realización del presente trabajo, con énfasis en la ayuda prestada por la Dra.C. Martha Álvarez Gil, el Ms.C. Juan G. Castillo Hernández, la técnica Mirtha López Machado y el administrador Pedro Brito Gaspar. También al Dr.C. Benedicto Martínez Coca, del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria de La Habana (CENSA); al Dr.C. Luis M. González Nuñez y Dr.C. Ramiro Ramírez, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", provincia de Granma, por las correcciones del documento y las fotos presentadas, respectivamente, y al Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara, por facilitar el material vegetal para realizar la investigación.

REFERENCIAS

- López, J.; Torres, M.; Borroto, C.; Trujillo, R.; Daquinta, M.; Gómez, R.; García, M.; Medero, V.; Ventura, J.; Montano, N.; Morales, A.; Cabrera, M.; Robaina, A.; Rayas, A. y Pons, C. Metodología para la propagación *in vitro* del boniato. En: Jornada Aniversario del INIVIT (35:2002:Santo Domingo), 2002. p. 18.
- Merkle, S.; Parrot, W. y Flinn, B. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: T. A. Thorpe (ed). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Klumer Academic Publishers, 1995, p. 155-203.
- Freire, M. Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp.) Híbrido var. C 87-51, empleando medios de cultivo líquidos. En: Jornada Aniversario del INIVIT, Santo Domingo (35:2002:Santo Domingo), 2001, p. 56.
- Parrot, W. La embriogénesis somática en las angiospermas. Conferencia. En: Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Resúmenes. Instituto de Biotecnología de las Plantas (6:2002:Santa Clara), 2002. p. 7-17.
- Cornide, M. T.; Sánchez, J. y Calvo, D. Identificación de genotipos y progenitores. En: Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. La Habana, 2002, p. 212-220.
- Ford-Llyod, B. Genotyping in plant genetic resources. Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plant. CAB. International, 2001. 56 p.
- Portieles, R.; Rodríguez, R.; Hernández, I.; Canales, E. y Cornide, M.T. Determinación del número cromosómico de un grupo de clones silvestres de origen desconocido y clones de fundación del complejo *Saccharum*. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 2, p. 69-72.
- Román, M. I.; González, C.; Xiquez, X.; Alonso, M.; Acosta, R.; Sánchez, I.; Pérez, L. y Casañas, J. Análisis genético-bioquímico de clones de plátano fruta y vianda (*Musa* sp.). Resúmenes. En: Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg '2001). Ciego de Ávila, Cuba, 2001, p. 39.
- Vargas, D.; Roque, A. y Hector, E. Empleo de la técnica AFLP para determinar la estabilidad de plantas de frutabomba (*C. papaya* cv. Maradol rojo) durante la micropropagación. Resúmenes. En: Congreso Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana (8:2002:La Habana), 2002, p. 24.
- Rodríguez, Y.; Noval, B. de la; Pérez, E. y Fernández, F. Expresión de peroxidases y polifenoloxidasas en raíces de *Sorghum bicolor* inoculadas con distintas especies de hongos micorrízicos arbusculares. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 2, p. 23-28.
- González, C. A. Detección de polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. En: Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. La Habana, 2002, p. 36-66.
- Valdés, M.; Román, M. I.; González, C. L.; Xiquez, X.; Beovides, Y. y Rodríguez, S. Estudio de las afinidades genéticas en clones de *Manihot esculenta* Crantz de importancia económica para Cuba. *Biotecnología Vegetal*, 2003, vol. 3, no. 2, p. 105-109.
- Cornide, M. T. Genética Vegetal. En: Cuba. Amanecer del Tercer Milenio. Ciencia, Sociedad y Tecnología. La Habana : Editorial DEBATE, 2002. 414 p.
- Vera, C. L.; Paredes, M. y Becerra, V. Estudio comparativo de diversidad morfológica, isoenzimas y RAPDs dentro y entre clases comerciales de Frijol chileno (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica*, 1999, vol. 59, no. 4, p. 247-259.
- Demeke, T.; Sasikumar, B.; Hucl, P. y Chibbar, R. Random Amplified Polymorphic DAN (RADP) in Cereal Improvement. *Maydica*, 1997, vol. 42, p. 133-142.
- CUBA. Minagri. Instructivo técnico sobre el cultivo del boniato. La Habana : SEDAGRI/AGRINFOR., 1998. 21 p.
- González, O.; Silva, J.; Espinosa, A.; Oliva, E.; Milanés, I. Efecto de la iluminación en la inducción de callos morfológicos en boniato. *Biotecnología Vegetal*, 2001, vol. 1, no. 2, p. 89-92.
- Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantar.*, 1962, Vol. 15, p. 473-497.
- Dellaporta, L.; Woody, J. y Hich, J. A plant molecular DNA minipreparation. Versión II. *Plant Mol. Biol.*, 1983, vol. 1, p. 19-21.

20. Peteira, B.; Fernández, B.; García, P.; Miranda, E.; León, O. y Miranda, I. Repetibilidad de los marcadores RAPD en el género *Lycopersicon*. Breve estudio. *Protección Vegetal*, 1999, vol. 14, no. 2, p. 75-79.
21. Peteira, B.; Fernández, E.; González, M.; Shagarodsky, T. e Miranda, I. Aplicación de marcadores RAPD al estudio de la diversidad genética en Cuba. *Protección Vegetal*, 2001, vol. 16, no. 2-3, p. 84-91.
22. Ramírez, R. Uso de bajas dosis de rayos x en la estimulación del crecimiento, rendimiento y calidad del fruto en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). [Tesis de Grado]; INCA. 2005, 99 p.
23. Rodríguez, M. y Arencibia, A. Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas Analíticas. En: M.T. Cornide (ed). Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. 2002, p. 13-35.
24. Coto, O. y Cornide, M. T. Principales aplicaciones de los marcadores moleculares. En: M.T. Cornide (ed). Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. La Habana, 2002. p. 92-119.
25. Ipek, M. e Ipek, A. Comparing of AFLPs, RAPD markers, and isoenzymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2003, vol. 128, no. 2, p. 246-252.
26. Bamberg, J. y Rio, A. del. Vulnerability of alleles in the us potato gene bank extrapolated from RAPDs. *Amer. J. of Potato Res.*, 2003, vol. 80, p. 79-85.
27. Tseng, Y.; Lo, H. y Hwang, S. Genotyping and assessment of genetic relationships in elite polycross cultivars of sweet potato in Taiwan based on SAMPL polymorphism. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2001, vol. 43, p. 99-104.
28. Sánchez, M.; Martínez, M.; Valladares, S.; Ferro, E. y Vièitez, A. Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *J. Plant Physiology*, 2003, vol. 160, p. 699-707.
29. Medero, V.; Rodríguez, S.; Borroto, C.; Gómez, R.; Escobar, R.; Gallego, G.; Thome, J.; Beovides, J.; López, J.; García, M.; Ventura, J. de La C.; Cabrera, M.; Basail, M.; Pons, C.; Rayas, A.; Santos, A.; Folqueras, M.; Cruz, M.; Martínez, M.; Toledo, H.; Guerra, D.; Álvarez, M.; y García, J. Estudio agronómico y de estabilidad genética en vitroplantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Resúmenes. En: Seminario Científico del INCA (14:2004:La Habana), 2004. p. 94.
30. González, M. E. Micropropagación de cafeto (*Coffea canephora* P. var. Robusta) mediante la embriogénesis somática con el empleo de metabolitos de origen bacteriano. Tesis de Grado [Dr. en Ciencias Agrícolas]; INCA. 2003, 97 h.

Recibido: 24 de octubre de 2006

Aceptado: 15 de mayo de 2007

Cursos de Verano

Precio: 320 CUC

Uso de técnicas biotecnológicas y nucleares en el mejoramiento genético para la tolerancia al estrés abiótico

Coordinador: Dra.C. María C. González Cepero

Fecha: julio

Duración: 40 horas

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (47) 86-3773
Fax: (53) (47) 86-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu