

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ACCESIONES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Sandra H. Díaz[✉], R. Morejón, Clara T. González y Xonia Xiqués

ABSTRACT. This paper presents the genetic-biochemical characterization of 19 rice (*Oryza sativa* L.) entries belonging to the germplasm collection from “Los Palacios” Rice Research Station, Pinar del Río. This study included not only Cuban varieties but genotypes coming from seven countries, which are widely used as parents in the genetic and plant breeding programs of this crop. The electrophoretic analyses were performed in polyacrilamide gel for total proteins and peroxidase, esterase and polyphenoloxidase isoenzymes. The results were processed by means of MAT-GENE programs and Cluster analysis, which proved diversity among genotypes with differences for all proteic systems studied. Peroxidase and esterase isoenzymes showed the highest genetic polymorphism.

Key words: rice, *Oryza sativa*, isozymes, genetic polymorphism

RESUMEN. Se realizó la caracterización genético-bioquímica de 19 accesiones de arroz (*Oryza sativa* L.), pertenecientes a la colección de germoplasma de la Estación Experimental del Arroz “Los Palacios”, Pinar del Río. Este estudio incluyó además de variedades cubanas, genotipos procedentes de siete países, los cuales son muy utilizados como progenitores en los programas de mejoramiento genético de este cultivo. Los análisis electroforéticos fueron realizados en gel de poliacrilamida para las proteínas totales y las isoenzimas peroxidadas, esterases y polifenoloxidadas. Los resultados fueron procesados mediante el paquete de programas MAT-GEN y un análisis de Conglomerados, lo que demostró diversidad entre los genotipos, ya que se encontraron diferencias para todos los sistemas proteicos estudiados. Las isoenzimas peroxidadas y esterases resultaron ser las de mayor polimorfismo genético.

Palabras clave: arroz, *Oryza sativa*, isoenzimas, polimorfismo genético

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de las isoenzimas ha favorecido el empleo de marcadores genéticos más eficientes que los morfológicos, ya que por lo general permiten distinguir genotipos homocigóticos de los heterocigóticos, o sea, igualar el fenotipo de los individuos con su respectivo genotipo.

Los estudios de polimorfismo isoenzimático en colecciones de germoplasma, pueden ser muy útiles para el informe y mantenimiento de la diversidad genética presente en las colecciones. Las isoenzimas han sido utilizadas para estudiar la dinámica poblacional, agrupar los sistemas de varias especies y para estimar la variabilidad genética presente en especies y variedades de diferentes cultivos (1, 2). Además, estos marcadores pueden ser útiles en la determinación del grado de polimorfismo presente en las colecciones y la caracterización de loci potencialmente marcadores, que pueden ser utilizados en estudios genéticos dentro de los programas de mejoramiento (3).

Las técnicas electroforéticas hacen posible el estudio de la variación genética y las similitudes y diferencias entre organismos en el ámbito de su composición enzimática o proteica. Esto permite realizar una caracterización a nivel molecular de la cantidad y tipo de variabilidad genética existente entre especies estrechamente relacionadas, dado que en este caso la variación de los patrones de bandas, en general, puede ser directamente igualada a la variación en el código genético para las proteínas variantes (4).

El polimorfismo enzimático constituye un aspecto particularmente interesante en la variabilidad fenotípica, ya que al ser ésta representativa de sistemas genéticos bastante simples, brinda un reflejo directo de la variabilidad genética. Dada su utilidad como un instrumento capaz del marcaje genético, desde hace más de una década se han desarrollado diversos estudios encaminados a conocer la composición isoenzimática en el género *Oryza* (5, 6, 7, 8).

Teniendo en cuenta lo antes expuesto se desarrolló el siguiente trabajo, con el objetivo de caracterizar bioquímicamente un grupo de accesiones de arroz, utilizadas frecuentemente en los programas de mejoramiento genético de este cultivo.

Ms.C. Sandra H. Díaz y Ms.C. R. Morejón, Investigadores de la Estación Experimental del Arroz “Los Palacios” del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Dras. Clara T. González y Xonia Xiqués, Profesoras de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, Cuba.

✉ palacios@inca.edu.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. El material vegetal estudiado lo constituyeron 19 accesiones de arroz (*Oryza sativa* L.) de la colección de germoplasma de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios", Pinar del Río, que incluyó además de genotipos cubanos, variedades procedentes de diversos países (Tabla I), sembrados de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado en la referida Institución.

Tabla I. Genotipos analizados, progenitores y procedencia

No	Genotipos	Progenitores	Procedencia
1	IR-1529-430	Sigadis 2/TN-1//IR-24	Filipinas
2	Perla de Cuba	IR-1529-430/VNIIR 3223	Cuba
3	J-104	IR-880-5-2//IR-930-16-1	Perú
4	INCA LP-1	J-104/Amistad 82	Cuba
5	Ceysvoni	SML 997/Awai	Surinam
6	Century Patna	Tejas Patna/Rexoro/IR Blurssa	U.S.A.
7	M-55	Desconocido	Desconocido
8	IR-36	IR-1561-228//4*IR-24/O.Niv//CR 94-3	Filipinas
9	Pokkali	Desconocido	Srilanka
10	Tetep	Desconocido	Desconocido
11	IR-759-54-2-2	IR-8/(Peta/3 x Dawn)	Filipinas
12	IR-837	IR-262-43-8-11/Niaw San Pahtawng	Filipinas
13	Cica-8	CICA-4//F1 IR-665/Tetep	Colombia
14	INCA LP-2	IR-759-54-2-2/6066	Cuba
15	INCA LP-5	2077/CP1-C8	Cuba
16	INCA LP-8	Somaclón Amistad'82	Cuba
17	Oryzica-1	P 1223/P 1225	Colombia
18	2084 Vietnamita	Desconocido	Desconocido
19	8551	Mutante Amistad'82	Cuba

Para la caracterización genético-bioquímica de dichas accesiones, los genotipos fueron sembrados en el período poco lluvioso de 1997-1998 en condiciones de invernadero, colectándose posteriormente las muestras a los 45 días. Los análisis electroforéticos de isoenzimas y proteínas totales, se realizaron a partir de la colecta de hojas sanas del tercio medio y fueron envasadas en sobres de polietileno a -4°C hasta su procesamiento.

Preparación de las muestras y análisis de las corridas. Para la preparación de las muestras, se maceraron cinco gramos de hojas sanas en un mortero, a los cuales se les añadieron 30 gotas de una solución de sacarosa al 20 %. Los extractos fueron filtrados en tela de gasa doble, envasados en frascos de cristal y mantenidos a -4°C hasta su posterior utilización.

Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliacrilamida (PAGE) utilizando un gel de separación de 8.5 %, con *buffer* de corrida Tris-Glisina 0.04 M de pH 8.3 y gel concentrador de 4 % en cámara de electroforesis vertical *Mighty Small II* de Pharmacia Biotech y en sistema de *buffers* discontinuos para las isoenzimas peroxidadas, esterases y polifenoloxidasas.

Las tinciones de las bandas se realizaron de acuerdo con los sistemas isoenzimáticos analizados (Tabla II) y se confeccionaron los zimogramas con los resultados obtenidos.

Tabla II. Métodos de tinción empleados para los sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales

Tipo de enzima	Sistema enzimático	Nomenclatura	Método de tinción
Oxidoreductasa	Prx	E.C.1.11.1.7	(9)
	PPO	E.C.1.10.3.1	
Hidrolasas	Est	E.C.3.1.1.-	(10)
Proteínas totales			

Procesamiento estadístico de los datos. Los fenotipos proteicos e isoenzimáticos de cada genotipo fueron establecidos sobre la base del número y la posición de cada banda, considerando como cero la ausencia y como uno la presencia de bandas. A partir de los resultados obtenidos en los zimogramas para los sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales, se analizaron las semejanzas entre los genotipos con el empleo del programa MAT-GEN (11) para obtener la matriz de similitud por el índice de Apóstol o *Simple Matching*.

La matriz de similitud fue procesada por un análisis de Conglomerados (*Cluster*) para representar mediante un dendrograma las relaciones genéticas entre el material estudiado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis cualitativo de la composición electroforética de las proteínas totales, permitió apreciar un total de nueve bandas en las 19 accesiones estudiadas, siendo seis de ellas comunes a todos los genotipos (Figura 1).

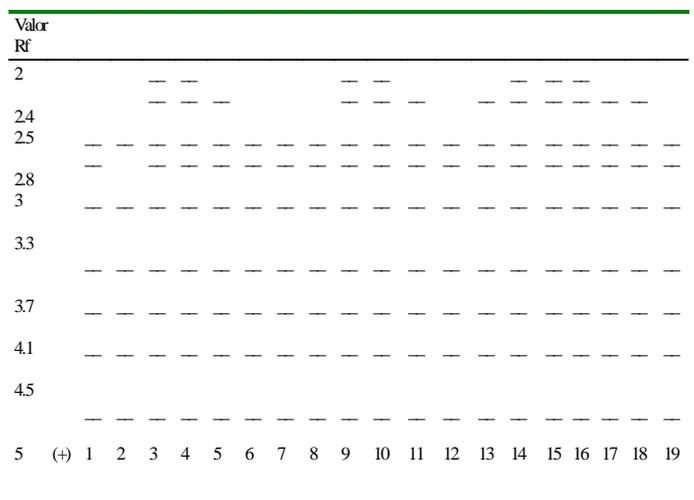


Figura 1. Proteinograma para las accesiones estudiadas

En esta figura se observó que de las tres bandas polimórficas, la banda de 3.0 unidades no sólo aparece en la variedad Perla de Cuba, mientras que se encontraron ausentes las bandas de 2.4 y 2.5 unidades en las variedades IR-1529-430, Perla de Cuba, Century Patna, M-55, IR-36, IR-837 y en el mutante 8551; sin embargo,

la banda de 2.5 unidades fue también común a los cultivares Ceysvoni, IR-759-54-2-2, Cica-8, Oryzica-1 y 2084 Vietnamita. En diferentes cultivos, los resultados de los proteinogramas también muestran un gran número de bandas y las diferencias entre las entidades están dadas principalmente por la ausencia de algunas de ellas (1, 2, 3).

En el zimograma de las isoenzimas peroxidadas (Figura 2), se comprobó la existencia de una alta actividad enzimática en el material analizado, pues este sistema presentó un total de doce bandas, de las cuales cuatro fueron comunes a todas las accesiones.

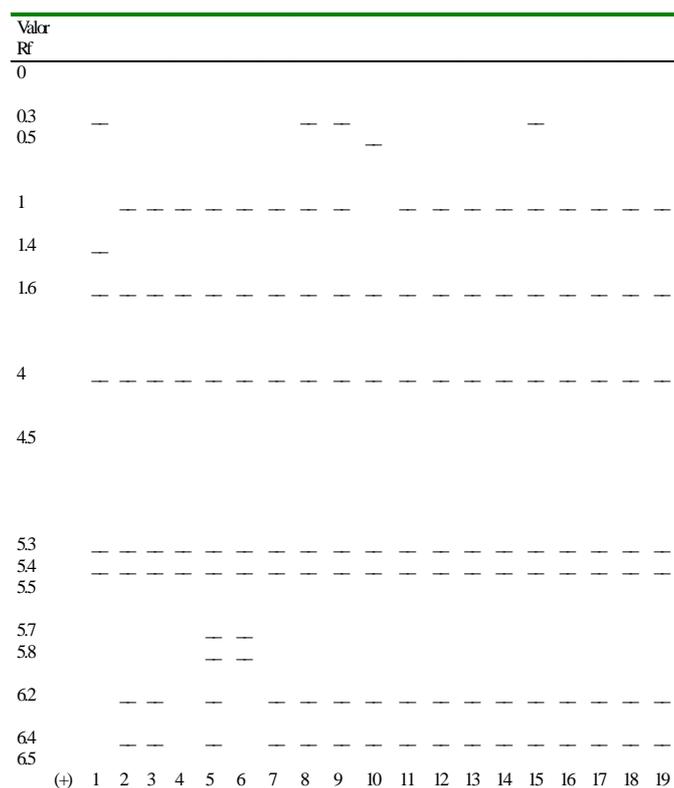


Figura 2. Zimograma de peroxidadas

Las bandas uno y dos que resultaron ser las de mayor movilidad electroforética con 6.5 y 6.2 unidades respectivamente, se ausentaron en las variedades IR-1529-430, INCA LP-1 y Century Patna.

Asimismo las bandas de 5.7 y 5.8 unidades están presentes solamente en las variedades Ceysvoni y Century Patna. La banda de 1.4 unidades caracterizó únicamente a IR-1529-430, ausentándose en el resto de las variedades; sin embargo, la banda de 1.0 unidades común a la mayoría de los genotipos está ausente en IR-1529-430 y Tetep. La banda de 0.5 unidades sólo se presenta en el cultivar Tetep y la de 0.3 unidades en IR-1529-430, IR-36, Pokkali e INCA LP-5.

Las isoenzimas peroxidadas son muy empleadas en los estudios genético-bioquímicos en plantas, por ser uno de los sistemas más polimórficos y por la estabilidad y reproducibilidad de sus bandas, además del papel que

ellas desempeñan en la biosíntesis de los componentes de la pared celular, así como en la regulación del crecimiento, la diferenciación celular y su relación con la resistencia a factores adversos tanto bióticos como abióticos (5 y 6).

Un polimorfismo enzimático fue observado también en la composición de las isoenzimas estererasas (Figura 3); en este sistema se presentan tres bandas comunes a todas las accesiones y tres bandas polimórficas, además de bandas propias, conformando un total de ocho bandas.

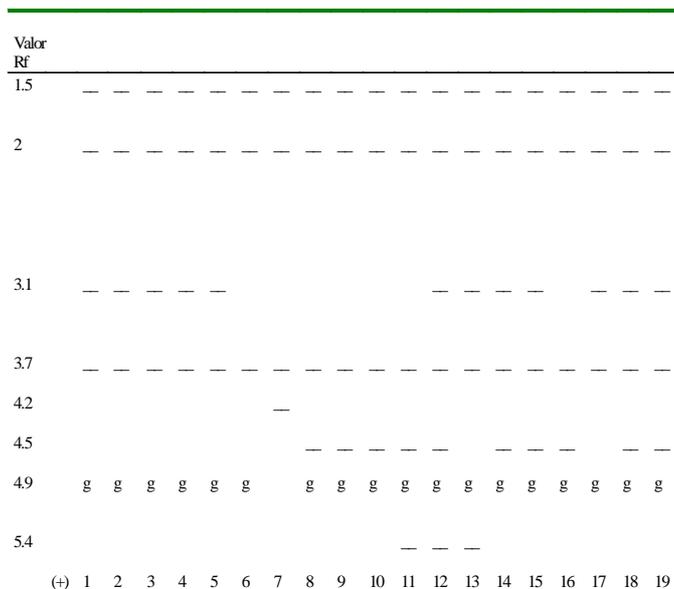


Figura 3. Zimograma de estererasas

Las bandas de 1.5, 2.0 y 3.7 unidades fueron comunes a todas las accesiones. La banda de 5.4 unidades solo aparece en los cultivares IR-759-54-2-2, IR-837 y Cica-8 y la banda de 4.2 unidades únicamente se presenta en la variedad M-55; por el contrario, la banda de 4.9 unidades apareció en todas las accesiones a excepción de M-55. La banda de 4.5 unidades se presenta solamente en las variedades IR-36, Pokkali, Tetep, IR-759-54-2-2, IR-837, INCA LP-2, INCA LP-5, INCA LP-8, 2084 Vietnamita y el mutante 8551, mientras que la banda de 3.1 unidades se ausenta en las variedades Century Patna, M-55, IR-36, Pokkali, Tetep, IR-759-54-2-2 e INCA LP-8.

El marcado polimorfismo que se presenta en este sistema ha sido informado también por otros autores, al estudiar el nivel de ploidía en clones de plátanos (12). También se ha encontrado similar polimorfismo enzimático en tejido foliar de tomate, lo que ha permitido diferenciar accesiones en este cultivo (1).

En la Figura 4 se pueden observar los resultados del zimograma de polifenoloxidasas con un total de cuatro bandas monomórficas y una banda polimórfica presente en el grupo de variedades INCA LP-1, Century Patna, IR-759-54-2-2, IR-837, Cica-8, INCA LP-2, Oryzica-1 y el mutante 8551. La presencia de un marcado monomorfismo, en estas isoenzimas, ha sido referida para otros cultivos (1, 13).

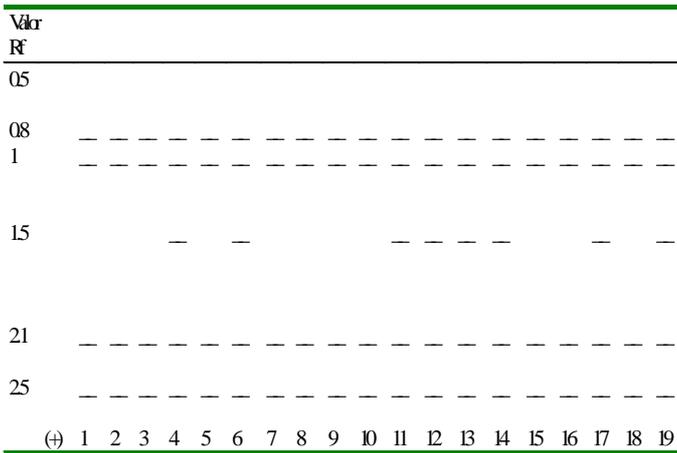


Figura 4. Zimograma de polifenoloxidasas

Se comprobó la presencia de una alta resolución electroforética para dichos sistemas (Tabla III), lo que indica que son de utilidad en la evaluación del polimorfismo varietal existente en este material, siendo las enzimas peroxidasa y esterasas las más recomendadas por su polimorfismo; resultados similares fueron obtenidos al realizarse el análisis integral de la variabilidad enzimática a mutantes de la variedad J-112, donde se detectó la existencia de algunos sitios de actividad enzimática polimórfica (14). En general, se ha determinado que las isoenzimas peroxidasa y esterasas se encuentran entre los sistemas más polimórficos en las plantas (7, 8, 15).

Tabla III. Análisis integral de la variabilidad genética encontrada

Sistema	Total de bandas por sistema	No. de bandas monomórficas	No. de bandas polimórficas (%)
Prx	12	4	8 (66.6)
Est	8	3	5 (62.5)
Ppo	5	4	1 (20.0)
PT	9	6	3 (33.3)
Total de bandas	34	17	17 (50.0)

La Tabla IV muestra los patrones isoenzimáticos obtenidos para cada sistema al aplicar el paquete de programas MAT-GEN.

Las isoenzimas peroxidasa muestran siete patrones diferenciales, presentando las variedades IR-1529-430, INCA LP-1, Ceysvoni, Century Patna y Tetep patrones propios que los distinguen del resto; sin embargo, son idénticos para Perla de Cuba, J-104, M-55, IR-759-54-2-2, IR-837, Cica-8, INCA LP-2, INCA LP-8, Oryzica-1, 2084 Vietnamita y 8551, así como entre IR-36, Pokkali e INCA LP-5.

Para las esterasas se presentan nueve patrones, siendo igual para IR-1529-430, Perla de Cuba, J-104, INCA LP-1, Ceysvoni y Oryzica-1, entre IR-36, Pokkali, Tetep e INCA LP-8, asimismo para INCA LP-2 e INCA LP-5 y por último para 2084 Vietnamita y 8551. Las variedades Century Patna, M-55, IR-759-54-2-2, IR-837 y Cica-8 mostraron patrones propios.

Tabla IV. Patrones electroforéticos obtenidos en los sistemas isoenzimáticos analizados mediante el programa MAT-GEN

Patrón	Peroxidasas		Esterasas	
	Patrón	Genotipos	Patrón	Genotipos
100111110000	1		11110010	1, 2, 3, 4, 5, 17
001011110011	2, 3, 7, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19		11010010	6
001011110000	4		11011000	7
001011111111	5		11010110	8, 9, 10, 16
001011111100	6		11010111	11
101011110011	8, 9, 15		11110111	12
010011110011	10		11110011	13
			11110110	14, 15
			11110110	18, 19
Polifenoloxidasas		Proteínas Totales		
Patrón	Genotipos	Patrón	Genotipos	
11011	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 18	0011111111	1, 6, 7, 8, 12, 19	
11111	4, 6, 11, 12, 13, 14, 17, 19	0010111111	2	
		1111111111	3, 4, 9, 10, 14, 15, 16	
		0111111111	5, 11, 13, 17, 18	

Legenda:

#	Variedad	#	Variedad	#	Variedad	#	Variedad
1	IR-1529-430	6	Century Patna	11	IR-759-54-2-2	16	INCA LP-8
2	Perla de Cuba	7	M-55	12	IR-837	17	Oryzica-1
3	J-104	8	IR-36	13	Cica-8	18	2084 Vietnam
4	INCA LP-1	9	Pokkali	14	INCA LP-2	19	8551.
5	Ceysvoni	10	Tetep	15	INCA LP-5		

Las polifenoloxidasas solamente mostraron dos patrones que agrupan a las variedades IR-1529-430, Perla de Cuba, J-104, Ceysvoni, M-55, IR-36, Pokkali, Tetep, INCA LP-5, INCA LP-8 y 2084 Vietnamita y a INCA LP-1, Century Patna, IR-759-54-2-2, IR-837, Cica-8, INCA LP-2, Oryzica-1 y 8551.

Las proteínas totales revelaron idéntico patrón para IR-1529-430, Century Patna, M-55, IR-36 e IR-837, para J-104, INCA LP-1, Pokkali, Tetep, INCA LP-2, INCA LP-5 e INCA LP-8 y finalmente para Ceysvoni, IR-759-54-2-2, Cica-8, Oryzica-1 y 2084 Vietnamita. La variedad Perla de Cuba se distingue del resto, presentando un patrón propio.

Partiendo del índice de similitud de Apóstol o *Simple Matching*, obtenido por la frecuencia de aparición de las bandas en los sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales mediante el programa MAT-GEN, se obtuvo el dendrograma de la Figura 5.

Puede observarse en esta figura la formación de diez grupos, con las mayores semejanzas dentro de los grupos IV y V.

En el grupo IV están la mayoría de las variedades INCA LP, las cuales fueron obtenidas por métodos convencionales y biotecnológicos en la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios", a las que se le unen las variedades comerciales actualmente en producción Perla de Cuba y J-104, todas ellas con un buen potencial productivo.

En el grupo V se presentan en su mayoría variedades introducidas en nuestro país desde Colombia y Filipinas y que en general tuvieron un comportamiento morfoagronómico similar.

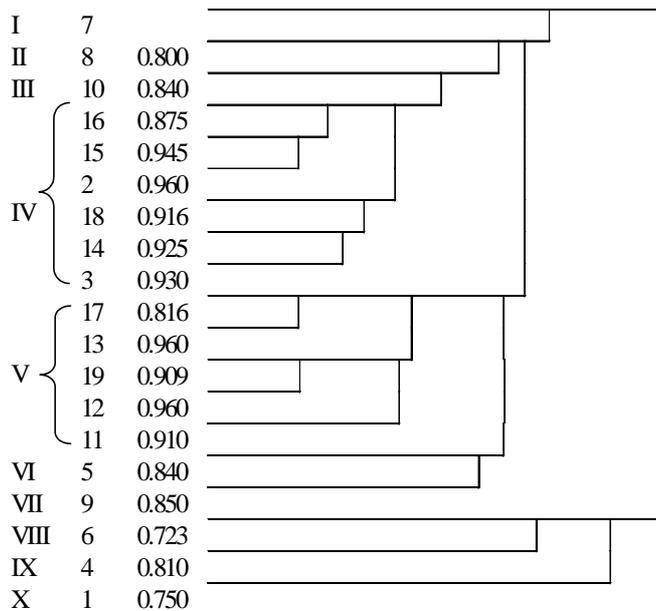


Figura 5. Dendrograma obtenido mediante el análisis de conglomerados de los resultados de los sistemas isoenzimáticos y proteínas totales

Debe destacarse que dentro de estos dos grupos las afinidades genéticas son mayores.

El resto de las variedades se ubican en grupos independientes y son accesiones que en general tuvieron un comportamiento diferencial en su fenotipo, caracterizado por rendimientos agrícolas bajos; sin embargo, estas variedades han sido referidas por diversos autores como fuentes de resistencia al estrés biótico y abiótico.

Al realizar el análisis en conjunto de las variables bioquímicas, queda establecida la semejanza existente entre todas las variedades estudiadas, lo cual indica orígenes similares y el empleo de progenitores comunes en diferentes cruzamientos. A esto se le une iguales objetivos en la mayoría de los programas de mejoramiento genético y selección, que son el obtener genotipos con altos rendimientos y resistencia a plagas y enfermedades. Se señala como una de las mayores limitaciones de los programas de mejoramiento de América Latina las reducidas fuentes genéticas existentes, lo que trae consigo una tendencia completamente común en dichos programas (15).

Podemos concluir que los sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales permitieron detectar diferencias entre las variedades, siendo las isoenzimas peroxidasa y esterasa las más polimórficas. Además, se comprobó una alta resolución electroforética para dichos sistemas, lo cual indica su utilidad en la evaluación del polimorfismo varietal en arroz. Se comprobó que no existían genotipos duplicados en la colección de germoplasma de arroz analizada y que entre las accesiones se presentan afinidades genéticas, las cuales son mayores dentro de los grupos IV y V.

Una vez más se pone de manifiesto la necesidad de combinar los análisis morfoagronómicos y genético-bioquímicos para la caracterización de los bancos de germoplasma del país. Asimismo, se evidencia la necesidad de continuar la búsqueda de nuevas formas polimórficas del cultivo, incorporando en lo posible técnicas mucho más polimórficas que permitan revelar la variación existente a nivel del ADN y contar con variabilidad genética suficiente para explotar en el cultivo del arroz.

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer a la Ms.C. Marilyn Florido y a la Lic. Mercedes Lara, del Departamento de Genética y Mejoramiento de Plantas del INCA, la ayuda desinteresada brindada para llevar a cabo las corridas electroforéticas y por sus valiosas sugerencias.

REFERENCIAS

1. Florido, M. Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate atendiendo a características morfobioquímicas y tolerancia al calor. [Tesis de Maestría]. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 1999, 87 h.
2. Acosta, R. Caracterización citogenética, morfoagronómica y genético-bioquímica de diez clones de plátano burro (*Musa Spp.*, Grupo ABB). [Tesis de Grado]. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 1999, 65 h.
3. Arias, E. Utilización de las enzimas en la caracterización de plantas de piña (*Ananas sp*) de interés para el mejoramiento. [Tesis de Maestría], Universidad de Ciego de Avila. 1998.
4. Iglesias, L. Utilización de marcadores bioquímicos y moleculares en el mejoramiento genético de la papa. *Cultivos Tropicales*, 1994, vol. 15, no. 2, p. 108-121.
5. Iglesias, L. y González, M. C. Estudios isoenzimáticos asociados con la tolerancia a la salinidad en arroz (*Oryza sativa L.*). *Cultivos Tropicales*, 1995, vol. 16, no. 1, p. 64-69.
6. Iglesias, L. y González, M. C. Variation in the total protein composition of a rice varietal group submitted to saline stress. *Cultivos Tropicales*, 1995, vol. 16, no. 1, p. 81-83.
7. Álvarez, A.; Fuentes, J. L.; Deus, J. E., Duque, M. C. y Cornide, M. T. Genetic diversity analysis in rice mutants using isozyme and morphological markers. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 4, p. 39-44.
8. Álvarez, A.; Fuentes, J. L.; Deus, J. E.; Duque, M. C. y González, M. C. Isozyme diversity in Cuban rice germplasm accessions. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 55-61.
9. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, p. 680-685.
10. Iglesias, L. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max (L) Merrill*). [Tesis de Grado] Dr. en Ciencias Biológicas, U.H. 1986.
11. Sigarroa, A. y Cornide, M. T. Paquete de programas MATGEN. La Habana. MATGEN, 1998.

12. Roman, M. J.; Rodríguez, A.; Xiqués, X.; González, C.; Rayas, A. y González, M. J. Caracterización isoenzimática de 17 clones diploides de plátano fruta *Musa spp.* *Biología*, 1997, vol. 11, no. 1, p. 61-70.
13. González, C., Valdes, M.; Román, M. I.; Xiqués, X.; García, H.; Hernández, I. y Márquez, M. Empleo de técnicas citogenéticas e isoenzimáticas en el estudio de haploides de *Nicotiana spp.* En: Resúmenes Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. (3:1998 jun. 1-5:La Habana). 240 p.
14. González, L. M. Uso de la radioinducción de mutaciones en la obtención de genotipos de arroz tolerantes a la salinidad. [Tesis de Grado]. Dr. en Ciencias Agrícolas. Instituto «Jorge Dimitrov». Granma. 1996, 92 p.
15. Fuentes, J. L.; Escobar, F.; Alvarez, A.; Gallego, G.; Duque, M. C.; Ferrer, M.; Deus, J. E. y Tohme, J. Analysis of genetic diversity in Cuban rice varieties using AFLP, RAPD and isoenzyme marker. *Euphytica* 1999, vol. 00, p. 1-9.

Recibido: 5 de abril del 2001

Aceptado: 7 de septiembre del 2001

MAESTRÍAS

Precio: 5 000 USD

- *Mejoramiento genético de las plantas*

Coordinador: Dra.C. María E. González Hernández

Duración: 2 años

Fecha de comienzo: febrero/2002

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) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu