

DIVERSIDAD Y RELACIONES GENÉTICAS ENTRE POBLACIONES ASNALES IBEROAMERICANAS

DIVERSITY AND GENETIC RELATIONSHIPS AMONG IBEROAMERICAN DONKEY POPULATIONS

Jordana J.^{1*}, Ferrando A.¹, Casas M.¹, Loarca A.², Martínez López O.R.³, Canelón J.L.⁴, Stemmer A.⁵, Aguirre L.⁶, Lara M.A.C.⁷, Álvarez L.A.⁸, Llambí S.⁹, Gómez N.¹⁰, Gama L.T.¹¹, Martínez R.D.¹², Pérez E.¹³, Guastella A.M.¹⁴, Marletta D.¹⁴, Landi V.¹⁵, Martínez A.¹⁵, Delgado, J.V.¹⁵

¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain

*Jordi.Jordana@uab.cat.

²Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Quetzaltenango, Guatemala.

³Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológica. Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay.

⁴Departamento de Producción e Industria Animal. Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado Barquisimeto. Venezuela.

⁵Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinaria. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

⁶Centro Biotecnología Reproductiva Animal. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.

⁷Instituto de Zootecnia. 13.460-000 Nova Odessa-SP, Brasil.

⁸Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Cra. 32 No 12-00, Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

⁹Instituto de Producción Animal, Área Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República (UdelaR). CP11600 Montevideo, Uruguay.

¹⁰Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Abancay, Perú.

¹¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal.

¹²Genética Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta 4 - Km. 2. 1836-Llavallol, Argentina.

¹³Departamento de Salud y Explotación Animal. Universidad de Granma. 85100-Bayamo, Cuba.

¹⁴DISPA, Sezione di Scienze delle Produzioni Animali, Università degli studi di Catania, Via Valdisavoia 5, 95123-Catania, Italy.

¹⁵Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. 14071, Córdoba, Spain.

Abstract

This study shows the results of the genetic characterization of 21 donkey populations of 14 countries from Europe (3) and Central and South America (11) associated to the CONBIAND network, in the framework of a collaborative project promoted by the network itself. Since sampled donkeys were not structured among breeds, donkeys from each American country were defined as discrete populations. These populations were analyzed with 14 microsatellite markers, and then compared with European breeds from Spain (6), Italy (3) and Portugal (1), in order to explore genetic relationships among them, and investigate the origins of current American populations. Results show that most of American populations do not group together with European ones, but tend to cluster separately instead. Concerning only the American meta-population, two major genetic groups are detected: the first one encompasses Caribbean countries, and second one includes countries from the Andes area and from the South. These results suggest that geographical isolation and a quite inexistent gene flow between continents together with a marked genetic drift would have contributed to the current genetic differentiation among populations, shaping distinct groups clearly differentiated among each other.

Keywords:

Biodiversity
Microsatellites
Population
substructure

Palabras clave:

Biodiversidad
Microsatélites
Subestructura
poblacional

Resumen

En el presente trabajo se muestran los resultados de la caracterización genética para un total de 21 poblaciones asnales correspondientes a 14 países de Europa (3) e Iberoamérica (11) asociados a la Red CONBIAND, dentro de un proyecto de colaboración promovido por la misma Red. Al no estar estructuradas por razas, las poblaciones americanas se han definido como poblaciones únicas de país. Estas poblaciones fueron analizadas

con un panel de 14 marcadores de ADN de tipo microsatélite, y posteriormente comparadas con razas asnales europeas originarias de España (6), Italia (3) y Portugal (1), con el fin de establecer las relaciones genéticas existentes entre ellas y poder clarificar el proceso de formación de las distintas poblaciones. Los resultados muestran que la gran mayoría de las poblaciones americanas analizadas no se agrupan claramente con las razas europeas, sino que tienden a diferenciarse genéticamente de éstas. Por otro lado, dentro de la propia meta-población americana, se distinguen principalmente dos grandes grupos: uno que englobaría países de influencia más caribeña, y otro que agruparía poblaciones del sur y de la zona andina de Sudamérica. Los resultados sugieren que el aislamiento geográfico y el casi nulo intercambio de reproductores entre continentes, conjuntamente con los efectos manifiestos de la deriva genética, habrían promovido la diferenciación existente entre las poblaciones, creando asimismo grupos singulares y claramente diferenciados entre sí.

Introducción

El estudio se enmarca en un proyecto de colaboración conjunta, auspiciado por la Red CONBIAND, con el objetivo de caracterizar genéticamente las poblaciones asnales de diferentes países Iberoamericanos asociados a la Red, y comparar sus niveles de diversidad genética con distintas razas europeas del área mediterránea. Las poblaciones europeas están perfectamente tipificadas en el rango taxonómico de raza; no así las americanas, por lo que éstas se han definido únicamente como país. El conocimiento primario de la variabilidad asnal intra-país podrá ser de gran utilidad, en un futuro cercano, para iniciar las correspondientes etapas de su particular caracterización genética, con la finalidad última de poder establecer poblaciones diferenciadas genéticamente (complementado de forma necesaria e imprescindible con los correspondientes estudios morfológicos), que puedan llegar a ser catalogadas en el estatus de razas domésticas diferenciadas. Esta futura caracterización y definición de población, ayudará a gestionar, de forma más óptima y eficiente, los correspondientes planes de conservación de los recursos zoogenéticos asnales. El presente trabajo pretende, asimismo, establecer las relaciones genéticas actuales existentes entre las razas estudiadas del Viejo y Nuevo Mundo, con el fin de establecer los posibles flujos migratorios e intentar clarificar el proceso de formación de las distintas poblaciones.

Material y métodos

En total han sido analizados 316 asnos americanos de 11 poblaciones distintas, definidas según el país de origen (Tabla I).

Tabla I. Parámetros de variabilidad genética en las poblaciones asnales americanas: N, número de individuos; H_O , heterocigosis observada; H_E , heterocigosis esperada no sesgada; NMA, número medio de alelos por *locus*; RA, riqueza alélica ajustada a un mismo número de individuos; proporción membresía al *cluster* 1 y 2 para un valor inferido de $K = 2$. (*Genetic variability parameters of American donkey populations: N, number of individuals; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected non-biased heterozygosity; NMA, mean number of alleles per locus; RA: rarefacted allelic richness; genome distribution to cluster 1 and 2 for $K = 2$ inferred clusters*)

| País | N | H_O | H_E | F_{IS} | NMA | RA ¹ | Cluster 1 | Cluster 2 |
|-----------|-----|-------------|-------------|----------|-----|-----------------|-----------|-----------|
| Guatemala | 15 | 0.532±0.227 | 0.573±0.207 | 0.074* | 4.6 | 4.5 | 0.29 | 0.71 |
| Brasil | 25 | 0.601±0.217 | 0.592±0.190 | -0.017 | 5.1 | 4.3 | 0.47 | 0.57 |
| Cuba | 70 | 0.563±0.236 | 0.566±0.237 | 0.004 | 5.7 | 4.4 | 0.06 | 0.94 |
| Venezuela | 27 | 0.466±0.270 | 0.505±0.273 | 0.079* | 4.0 | 3.5 | 0.05 | 0.95 |
| Colombia | 30 | 0.524±0.214 | 0.563±0.237 | 0.071* | 5.0 | 4.3 | 0.34 | 0.66 |
| Ecuador | 21 | 0.507±0.280 | 0.511±0.260 | 0.009 | 3.9 | 3.6 | 0.92 | 0.08 |
| Perú | 20 | 0.482±0.247 | 0.539±0.263 | 0.109** | 4.2 | 3.9 | 0.89 | 0.11 |
| Bolivia | 30 | 0.509±0.230 | 0.549±0.240 | 0.074* | 4.1 | 3.8 | 0.86 | 0.15 |
| Paraguay | 29 | 0.467±0.270 | 0.497±0.261 | 0.061* | 3.9 | 3.5 | 0.87 | 0.13 |
| Argentina | 25 | 0.493±0.220 | 0.523±0.239 | 0.059* | 4.9 | 4.1 | 0.85 | 0.15 |
| Uruguay | 24 | 0.365±0.234 | 0.452±0.277 | 0.196*** | 3.6 | 3.3 | 0.95 | 0.05 |
| Total | 316 | 0.509±0.221 | 0.567±0.245 | 0.103*** | 7.0 | 4.5 | | |

¹calculada para N = 12 individuos. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

El ADN de estos animales ha sido obtenido a partir de bulbos de pelo, utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Iberia SL). Estos perfiles han sido comparados con los de 455 asnos europeos de las 11 razas siguientes: Andaluza (N = 50), Balear (N = 50), Catalana (N = 50), Asno de las Encartaciones (N = 50), Majorera (N = 50) y Zamorano-Leonesa (N = 50), originarios de España; Pantesco (N = 39), Ragusano (N = 53) y Grigio Siciliano (N = 16), de la isla italiana de Sicilia; y Mirandesa (N = 40), de Portugal. Los asnos americanos fueron genotipados con 14 marcadores microsatélite: AHT4, AHT5, ASB23, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, HTG15 y VHL20. Los productos amplificados por PCR fueron separados mediante electroforesis capilar en un aparato ABI PRISM 3730 (Life Technologies). Los alelos fueron analizados y tipificados con el programa GeneMapper® v.3.7 (Life Technologies). Los parámetros de diversidad genética fueron calculados con el programa Genetix v.4.05.2 (Belkhir et al., 1996-2004) y los F-estadísticos con FSTAT v.2.9.3 (Goudet, 1995, 2001), usando los estimadores F , f y θ de Weir y Cockerham (1984) análogos a F_{IT} , F_{IS} y F_{ST} de Wright (1969). El error estándar y los intervalos de confianza fueron obtenidos mediante permutaciones de tipo *jackknife* y *bootstrap* entre *loci*, respectivamente. También se calculó la matriz de distancias de Reynolds *et al.* (1983) entre poblaciones americanas con el programa POPULATIONS v.1.2.28 (Langella, 2002). Se exploró la estructura de las poblaciones americanas con el método del análisis de *cluster*, basado en modelos implementados en el programa STRUCTURE v.2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa calcula un valor de probabilidad para un número de K poblaciones (o *cluster*) pre-determinado, y asigna la parte del genoma de cada individuo que deriva de cada *cluster*. La estructuración poblacional fue probada desde K = 1 hasta K = 6, con cinco réplicas independientes, consistentes en 100.000 pasos *Markov Chain Monte Carlo* tras un descarte de los primeros 200.000. Se asumió que las frecuencias alélicas de las poblaciones actuales estaban correlacionadas y que podían haberse originado a partir de más de una población ancestral. El valor más probable de K fue determinado según el método de Evanno *et al.* (2005) implementado en el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012). El parámetro Q define qué proporción del genoma de un individuo pertenece a los distintos *cluster* (K) pre-definidos. Se aceptó la membresía de una población a un *cluster* para valores medios de $Q > 0.80$. Se construyó un árbol no enraizado a partir de la matriz de distancias genéticas D_A de Nei *et al.* (1983) con el algoritmo *neighbor-joining*, con todas las poblaciones americanas y europeas. La solidez de las ramas fue testada mediante 5000 remuestros de tipo *bootstrap* entre *loci*. Para ello, se utilizó el programa POPULATIONS. En este análisis se descartó el *locus* HTG7, con el objetivo de utilizar un panel común de marcadores para todas las poblaciones, así como el *locus* HMS2 porque presentaba una fuerte desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) en las razas sicilianas (Bordonaro *et al.*, 2012).

Resultados y discusión

Poblaciones americanas

Se observaron un total de 98 alelos para los 14 marcadores en el conjunto de las 11 poblaciones, con una media de 7 alelos por *locus*. Se detectó un significativo déficit de heterocigotos al que contribuyeron casi todos los *loci*: $F_{IT} = 0.108 \pm 0.007$ (intervalo de confianza al 99% entre 0.090-0.123). Ese déficit fue debido, en parte, a una sub-estructuración poblacional en la meta-población americana, $F_{ST} = 0.058 \pm 0.006$ (0.045-0.073); y por otra parte a un déficit intra-poblacional, $F_{IS} = 0.053 \pm 0.008$ (0.035-0.073). El análisis bayesiano de estructuración muestra que las poblaciones americanas analizadas se dividen preferentemente en dos grandes grupos genéticos o *cluster* (K = 2). Los valores de membresía, a uno de los dos *cluster*, son superiores a 0.85 en ocho de las once poblaciones (Tabla I). El primer *cluster* englobaría países andinos y del sur del continente, mientras que el segundo englobaría países caribeños (Figura 1). Tres poblaciones tienen una distribución mixta: Brasil, Guatemala y Colombia. En el caso de Colombia, esta división se debe a que actúa como un punto de conexión entre los dos grupos, pues limita con poblaciones de ambos *cluster*. Se observa, asimismo, que los animales de esta población se agrupan preferentemente en uno u otro *cluster*, con valores individuales de Q en su mayoría superiores a 0.80. En cambio, en el caso de Brasil y Guatemala, los individuos presentan una asignación mixta en ambos *cluster*, con valores de membresía, a uno u otro grupo, muy variables (Figura 1). Unos pocos individuos de países del *cluster* 1 se agrupan con el *cluster* 2 (Figura 1). Esto puede deberse al flujo de migrantes del *cluster* 2 y/o a la retención de polimorfismos más ancestrales, pero también a la limitada potencia del panel de marcadores empleado. Globalmente, se halla una mayor diversidad y riqueza alélica en los países de membresía mixta, así como en Cuba. Esto podría deberse a que Cuba fue uno de los países por el que fueron introducidos los animales desde Europa o África, por lo que habría podido retener un acervo genético más diverso. La elevada variabilidad de Brasil y Guatemala podría derivarse de su localización geográfica entre

zonas de conexión de poblaciones, de flujos migratorios, o de su cercanía a las áreas de entrada de animales procedentes del Viejo Mundo. Se detectó una desviación significativa del HWE en varias poblaciones, especialmente en Uruguay (Tabla I). Varios *loci* contribuyeron al déficit, revelando la existencia de una posible mayor consanguinidad o de una subestructuración intra-poblacional. La menor diversidad genética, sumada a la menor riqueza alélica, sugieren que la población ha debido experimentar un mayor efecto de la deriva genética, debido a un mayor aislamiento reproductivo respecto a otras poblaciones del mismo *cluster*. De forma general, se observa que las poblaciones con menor diversidad fueron también las que presentaron una mayor distancia genética. El efecto del aislamiento por distancia fue perceptible en el *cluster* 1. Las poblaciones geográficamente más distantes entre sí, Ecuador y Uruguay, presentaron también la mayor diferenciación ($F_{ST} = 0.0862$, $P < 0.001$) y distancia genética ($D_{Reynolds} = 0.0925$) dentro de este grupo (Figura 2). En cambio, Perú, apenas presentó diferencias con respecto a Bolivia, Paraguay o Argentina (valores F_{ST} no significativos, $D_{Reynolds} < 0.015$) (ver Tabla II).

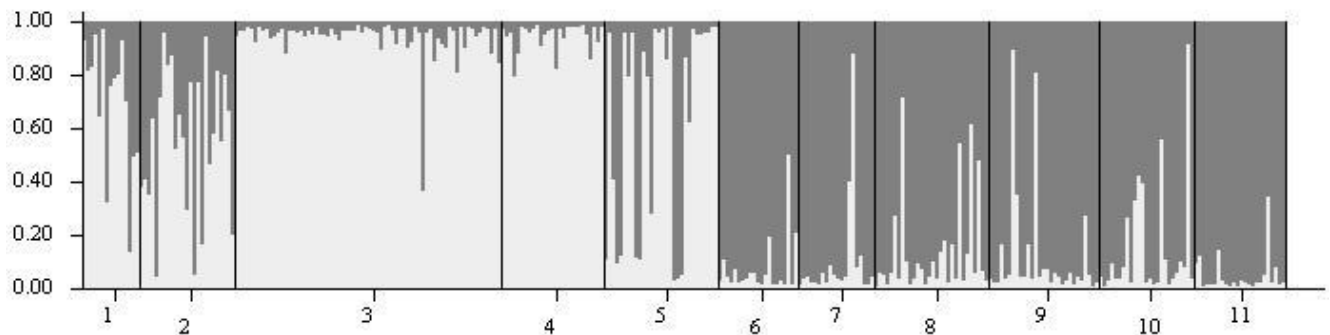


Figura 1. Distribución del genoma de cada individuo en los dos *cluster* inferidos ($K = 2$). Cada animal está representado por una barra vertical. La longitud del color de las barras en el eje vertical define la proporción de membresía (Q) al *cluster* 1 (gris oscuro) o *cluster* 2 (gris claro). Las poblaciones son las siguientes: Guatemala (1), Brasil (2), Cuba (3), Venezuela (4), Colombia (5), Ecuador (6), Perú (7), Bolivia (8), Paraguay (9), Argentina (10) y Uruguay (11) (*Genome distribution of individuals to each inferred cluster [$K = 2$]. Each individual is represented by a vertical single line. The length of colored lines, vertical axis, is proportional to Q values to inferred clusters 1 [dark grey] and 2 [light grey]. Populations represented in the plot are: Guatemala [1], Brazil [2], Cuba [3], Venezuela [4], Colombia [5], Ecuador [6], Peru [7], Bolivia [8], Paraguay [9], Argentina [10] and Uruguay [11]).*

Relaciones genéticas entre poblaciones de ambos continentes

En el árbol de relaciones genéticas (Figura 2), se observa que las razas europeas muestran una escasa estructuración entre ellas, con valores de robustez en la mayoría de las ramas por debajo del 50%. Sin embargo, se aprecia cierta diferenciación entre las razas italianas y las de la Península Ibérica e Islas Canarias. Por otro lado, no se aprecia distintivamente qué poblaciones europeas contribuyeron al actual acervo genético americano. Sólo la población de Guatemala tiende a agruparse con una raza europea, la Andaluza, tal vez por una fuerte influencia de esta raza en su origen, por una mayor retención del acervo genético ancestral unido a una menor deriva genética o por una posterior influencia de esta raza en la población asnal guatemalteca. Las poblaciones de asignación mixta presentan, en general, una menor distancia genética con las poblaciones de la Península Ibérica. Esto sería coherente con una mayor influencia ibérica en su actual acervo genético. Es posible que las poblaciones del *cluster* 1 americano hayan experimentado un mayor efecto del aislamiento por distancia desde el punto de entrada de los animales en el continente siglos atrás. Todo ello, unido a una fuerte deriva genética, se habría traducido en una menor diversidad genética, pero, también, en la formación de una huella genética propia. No obstante, tampoco se puede descartar la posible influencia histórica de los acervos genéticos de animales originarios de otras poblaciones, no analizadas en este estudio.

Conclusiones

Los resultados sugieren que el limitado flujo genético de animales entre Europa y América ha permitido una progresiva diferenciación de las poblaciones asnales americanas con respecto a las europeas, desde su llegada al

continente. Por otro lado, se ha observado una separación distintiva en dos *cluster* principales de las poblaciones del Centro y Sur del continente americano, separados, *grosso modo*, por la línea ecuatorial. No obstante, un panel más amplio de marcadores permitiría definir, con más precisión, como se inter-relacionan las distintas poblaciones de la meta-población americana.

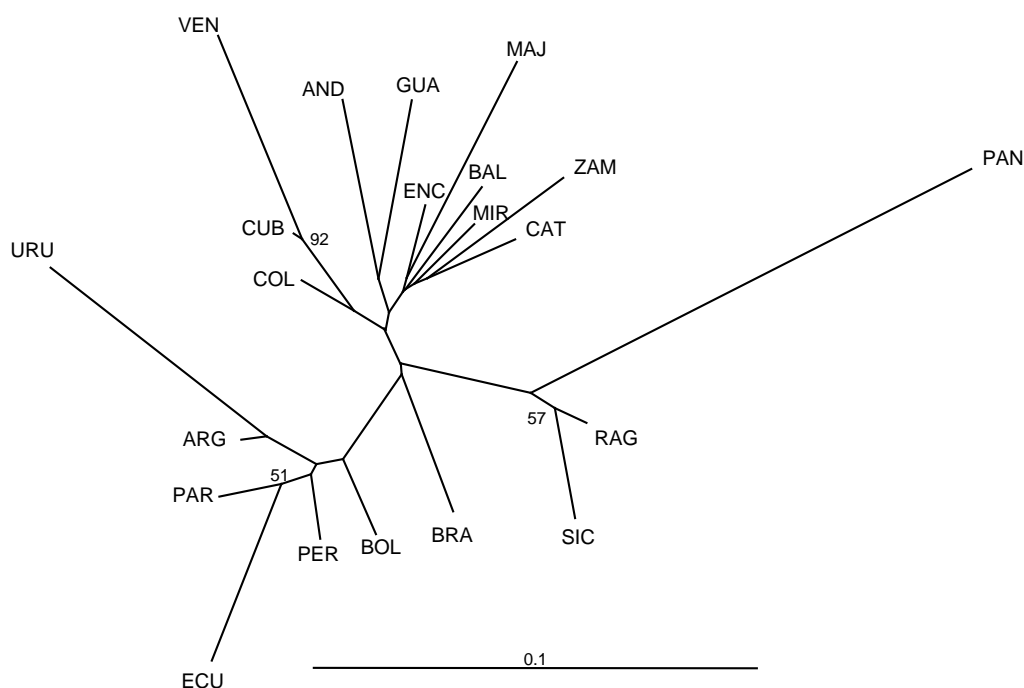


Figura 2. Árbol no enraizado obtenido con la distancia D_A de Nei *et al.* (1983) mediante el algoritmo *neighbor-joining* y 5000 *bootstraps* entre los *loci*. Se han empleado datos de 12 marcadores (excluyendo HTG7 y HMS2). Se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%. En la parte inferior, se indica la escala. Los nombres de las razas o poblaciones están representados mediante las tres primeras letras (*Unrooted tree obtained with the D_A distance of Nei et al. (1983) with the neighbor-joining algorithm, and 5000 bootstrap over loci. Data from 12 markers were used [HTG7 and HMS2 were excluded]. Bootstrap values over 50% are indicated. The genetic distance scale is indicated below the tree. Names of population and breeds are represented by the first three letters*).

Bibliografía

- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2004. *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bordonaro S., Guastella A.M., Criscione A., Zuccaro A. & Marletta D. 2012. Genetic diversity and variability in endangered Pantesco and two other Sicilian donkey breeds assessed by microsatellite markers. *The Scientific World Journal*, doi:10.1100/2012/648427.
- Earl D.A. & vonHoldt B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359–361.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611–2620.
- Goudet J. 2001. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)*. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Goudet J. 1995. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485–486.
- Langella O. 2002. *Population 1.2.28. Logiciel de génétique des populations*. Laboratoire Populations, génétique

et évolution, CNRS UPR 9034, Gif-sur-Yvette, <http://www.cnrs-gif.fr/pge/>.

- Nei M., Tajima R. & Tatenno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153–170.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Reynolds J., Weir B.S. & Cockerham C.C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105, 767–779.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358–1370.
- Wright S. 1969. *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 2. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press.

Tabla II. La diagonal superior contiene la matriz de valores F_{ST} entre las poblaciones americanas. El valor de significación fue obtenido con 55000 permutaciones y ajustando el valor nominal de P con la corrección de Bonferroni para múltiples tests independientes. En la matriz inferior, se presentan los valores de distancia ponderada de Reynolds et al. (1983), entre poblaciones (Above the diagonal, the F_{ST} matrix between American populations is shown. Significance values were obtained by means of 55000 permutations and adjusting the P nominal value with Bonferroni correction for multiple independent tests. Below the diagonal, the weighted distance matrix of Reynolds et al. (1983) is presented).

| | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) | (10) | (11) |
|----------------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Guatemala (1) | - | 0,044*** | 0,039*** | 0,078*** | 0,064*** | 0,091*** | 0,044*** | 0,048*** | 0,076*** | 0,077*** | 0,115*** |
| Brasil (2) | 0,046 | - | 0,051*** | 0,083*** | 0,039*** | 0,073*** | 0,025*** | 0,041*** | 0,051*** | 0,057*** | 0,081*** |
| Cuba (3) | 0,041 | 0,053 | - | 0,032*** | 0,033*** | 0,095*** | 0,046*** | 0,061*** | 0,056*** | 0,073*** | 0,103*** |
| Venezuela (4) | 0,083 | 0,087 | 0,033 | - | 0,050*** | 0,118*** | 0,070*** | 0,071*** | 0,082*** | 0,089*** | 0,127*** |
| Colombia (5) | 0,068 | 0,041 | 0,034 | 0,053 | - | 0,104*** | 0,031*** | 0,038*** | 0,058*** | 0,049*** | 0,094*** |
| Ecuador (6) | 0,098 | 0,075 | 0,100 | 0,127 | 0,111 | - | 0,033*** | 0,050*** | 0,046*** | 0,054*** | 0,086*** |
| Perú (7) | 0,048 | 0,026 | 0,048 | 0,075 | 0,033 | 0,035 | - | 0,001 n.s | 0,008 n.s | 0,012 n.s | 0,039*** |
| Bolivia (8) | 0,051 | 0,042 | 0,063 | 0,075 | 0,040 | 0,053 | 0,003 | - | 0,032*** | 0,019** | 0,059*** |
| Paraguay (9) | 0,081 | 0,053 | 0,058 | 0,087 | 0,061 | 0,048 | 0,010 | 0,034 | - | 0,029*** | 0,039*** |
| Argentina (10) | 0,082 | 0,059 | 0,076 | 0,094 | 0,051 | 0,056 | 0,014 | 0,020 | 0,031 | - | 0,030** |
| Uruguay (11) | 0,127 | 0,086 | 0,110 | 0,138 | 0,101 | 0,092 | 0,044 | 0,064 | 0,042 | 0,033 | - |

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; n.s., diferencias no significativas.