

UNIVERSIDAD DE COSTARICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Efecto de las extinciones locales sobre la estructura genética de poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Central de Costa Rica.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología, para optar por el grado de Magister Scientiae

DANIEL BARRANTES ARIAS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
Costa Rica

2003

## Dedicatoria.

*A Dios y a mis Padres por su apoyo y ayuda durante mis estudios...*

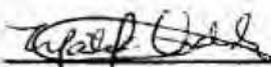
Agradezco al Ph.D Oscar J. Rocha por su orientación y guía como director de tesis y por haberme permitido realizar este proyecto bajo su tutela. A su esposa y parte del comité de tesis Ph.D María E. Zaldívar por su guía y apoyo académico. Por sus preguntas y comentarios oportunos al Ph.D Gustavo Gutiérrez Ezpeleta.

Muy especialmente agradezco al equipo de trabajo, compañeros y amigos. A Emilio Castro por su insustituible ayuda durante los muestreos de campo y por su arduo trabajo en la recolecta de datos fenológicos y en los censos de las poblaciones de frijol Lima del Valle Centra. Sin su trabajo previo, esta tesis no hubiera podido ser realizada. Mil gracias a Gabriel Aguilar y a Luis Castro por su guía en el laboratorio y la experiencia brindada en el diseño y mejora de los protocolos utilizados. A Mayrelit Artavia, Ana Araya e Iris Rodríguez por su amistad e inspiración final. Al incansable entusiasmo demostrado por Maguil Céspedes durante su estadía en el laboratorio, y al resto de personas con las que compartí ratos amenos mientras trabajaba en mi tesis.

Finalmente mi agradecimiento a las instituciones que brindaron el financiamiento a este proyecto. Estas son, Belgian Administration for Cooperation to Development (AGCD, Bruselas-Bélgica), International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI, Roma-Italia), Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (proyecto VI-801-93-586) y Faculté de Sciences Agronomiques de Gembloux (Gembloux-Bélgica).

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado de *Magister Scientiae*.

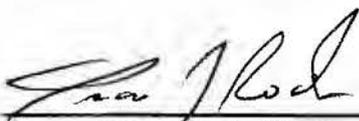
Dra. Marta Valdez Melara

  
En representación del  
Decano(a) del SEP

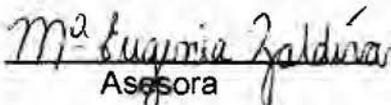
Dra. Virginia Solís Alvarado

  
Directora del Programa de  
Posgrado en Biología

Dr. Oscar J. Rocha Núñez

  
Director de Tesis

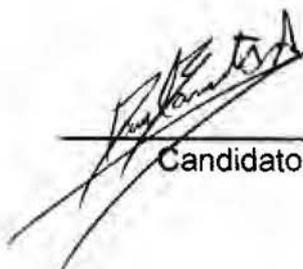
Dra. María E. Zaldívar Ruiz

  
Asesora

Dr. Gustavo Gutiérrez Ezpeleta

  
Asesor

Daniel Barrantes Arias

  
Candidato

## Índice

Presentación.....	i
Dedicatoria.....	ii
Hoja de Aprobación.....	iii
Índice.....	iv
Resumen General.....	vi
Introducción General.....	vi
Metodología.....	ix
Especie estudiada.....	ix
Área de estudio.....	ix
Estudio de las poblaciones.....	x
Dinámica de extinciones y colonizaciones.....	x
Análisis genético y poblaciones estudiadas.....	xi
Resultados.....	xii
Dinámica de extinciones y colonizaciones.....	xii
Variación genética en las poblaciones silvestres.....	xiii
Discusión.....	xv
Dinámica de extinciones y colonizaciones.....	xv
Variación genética en las poblaciones silvestres.....	xvii
Conclusiones.....	xviii
Dinámica de extinciones y colonizaciones.....	xviii
Variación genética en las poblaciones silvestres.....	xix
Palabras clave.....	xx
Director de la Investigación.....	xx
Referencias bibliográficas INTRODUCCIÓN GENERAL.....	xx
Lista de Cuadros.....	xxiii
Lista de Figuras.....	xxvi
<b>Primera Parte. Dinámica de extinciones locales y colonización de poblaciones silvestres de frijol Lima (<i>Phaseolus lunatus</i> L.) en el Valle Central de Costa Rica.....</b>	<b>01</b>
Resumen.....	01
Palabras clave.....	01
Introducción.....	01
Metodología.....	04

Especie estudiada.....	04
Área de estudio.....	04
Estudio de las poblaciones.....	05
Resultados.....	06
Poblaciones presentes, extintas y recolonizaciones.....	06
Discusión.....	15
Bibliografía PARTE 1.....	19

Segunda Parte. Efecto de las extinciones locales sobre la estructura genética de poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Centra de

Costa Rica.....	22
Resumen.....	22
Palabras clave.....	22
Introducción.....	22
Metodología.....	24
Especie estudiada.....	24
Área de estudio.....	25
Extinciones y recolonizaciones en las poblaciones del Valle Central.....	25
Poblaciones estudiadas.....	26
Extracción de ADN.....	27
Análisis genético.....	28
Resultados.....	29
Análisis genético.....	30
Poblaciones recolonizadas.....	31
Poblaciones testigo.....	35
Poblaciones manipuladas.....	39
Discusión.....	42
Diversidad genética en los grupos de poblaciones.....	44
Diferenciación genética en el tiempo.....	46
Dinámica poblacional y variación genética.....	48
Apéndice 1.....	52
Bibliografía PARTE 2.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

# **Estudio de la dinámica de metapoblaciones y el efecto de las extinciones locales sobre la estructura genética de poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Central de Costa Rica**

Barrantes Arias, Daniel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio". San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica. Año 2003.

## **Resumen del proyecto**

### **Introducción general**

El género *Phaseolus* (Fabaceae) es uno de los más antiguos géneros domesticados del Continente Americano (Baudoin 1988, Smith 1995). Se reconocen dos centros de diversificación correspondientes a las regiones Mesoamericana y Andina, aproximadamente 7000 años AP y 4700 años AP, respectivamente (Kaplan *et al.* 1973, Ford-Lloyd y Jackson 1986, Pearsall 1992, Baudoin 1988). Mac Neish (1964), Heiser (1965), Smith (1968) y Pickersgill (1977) aportaron evidencias que hacen suponer la independencia de ambas regiones en la domesticación de diferentes especies o variedades originarias de América Latina (Baudoin 1988, Smith 1995). Se reconoce sin embargo, la importancia que tuvo el Istmo Centroamericano en el intercambio, difusión y entrecruzamiento de las variedades originarias de ambas regiones (Baudoin 1988).

La característica fundamental que ha hecho importante el cultivo y domesticación del género *Phaseolus*, es el alto contenido de proteína de sus productos, semillas y el forraje, (Ford-Lloyd y Jackson 1986). Además, posee características agronómicas de interés, como el bajo contenido de humedad de las semillas y la dureza de su testa, lo que permiten su almacenamiento por largos períodos de tiempo.

El frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) es una de las principales especies cultivadas del género *Phaseolus* y es ampliamente variable en el ámbito morfológico. Se cultiva tanto en regiones de clima tropical como templado (Baudoin 1989). La variación morfológica en sus semillas han permitido separar la especie en tres variedades principales ("potato", "sieva" y "big Lima"), (Vargas 1997, Degreef 1998), y para las cuales se han sugerido distintos sitios de origen (Baudoin 1988, Maquet *et al.* 1999).

En la actualidad, tanto las especies del género *Phaseolus*, como la mayoría de los cultivos agrícolas experimentan una acelerada pérdida de variabilidad genética (Guarino *et al.*

1995). Los métodos tradicionales de mejoramiento, en busca del aumento en la productividad y la selección de ciertos caracteres como uniformidad, tamaño, calidad y presentación, han llevado a una acelerada erosión de los recursos genéticos, principalmente aquellos presentes en las razas locales. Es por ello que la protección y caracterización de las poblaciones silvestres, razas locales o especies silvestres emparentadas con las especies cultivadas, ha cobrado importancia en los últimos 20 años (Evans 1993, Potter *et al.* 1993, Guarino *et al.* 1995, Frankel *et al.* 1995, Vargas 1997, Primack 1998, Degreeef 1998).

El frijol Lima costarricense se encuentra en poblaciones silvestres. Estas se asocian a regiones alteradas tales como: terrenos agrícolas, pastizales y algunas están presentes en zonas urbanas (Maquet *et al.* 1996, Degreeef *et al.* 1997, Rocha *et al.* 1997, Degreeef 1998). En Costa Rica la variedad presente pertenece al reservorio genético mesoamericano (Rocha *et al.* 1997). Las características morfológicas de las semillas, recolectadas en poblaciones del Valle Central, apuntan a la variedad "sieva" (Vargas 1997), cuyos posibles centros de origen son la región México-Guatemala y la vertiente pacífica de la Sierra Madre Occidental (Baudoin 1988, Vargas 1997, Degreeef 1998)

A partir de 1992 se han realizado diversos esfuerzos en el país para censar, conservar y caracterizar la variabilidad genética de esta especie. Específicamente se ha trabajado con las poblaciones del Valle Central (Maquet *et al.* 1996, Degreeef *et al.* 1997, Rocha *et al.* 1997, Degreeef 1998). El crecimiento urbano de la región y el cambio en las prácticas agrícolas, han puesto en peligro de extinción a muchas de las poblaciones allí presentes (Maquet *et al.* 1996, Rocha *et al.* 1997). Se estima que bajo ciertas condiciones, estas poblaciones podrían desaparecer en menos de 32 generaciones (Degreeef *et al.* 1997).

La variabilidad genética (isoenzimas y faseolinas) y morfológica (dimensiones y peso de la semilla), de las poblaciones del frijol Lima, ha sido estudiada por Maquet *et al.* 1996, Rocha *et al.* 1997, Vargas 1997, Vargas *et al.* 2000. Asimismo se ha caracterizado la dinámica de algunas de las poblaciones presentes en el Valle Central (Degreeef *et al.* 1997, Degreeef 1998). Los resultados presentados por estos autores demostraron que existe una mayor diversidad y diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas que dentro de las mismas (Maquet *et al.* 1996, Rocha *et al.* 1997, Vargas 1997, Vargas *et al.* 2000), y han señalado que la alta tasa de endogamia y los cuellos de botella característicos de la dinámica de esta especie, podrían explicar la poca variación intrapoblacional (Vargas 1997, Rocha *et al.* 1997, Vargas *et al.* 2000). Además, las altas presiones a las que se encuentran sometidas las poblaciones de *P.lunatus* del Valle Central debido a la fragmentación, extinción y recolonización, contribuyen a que ocurra pérdida en la variabilidad genética de la especie (Vargas 1997, Rocha *et al.* 1997, Vargas *et al.* 2000).

Los estudios realizados en dinámica reproductiva y dispersión de semillas demostraron que una cualidad importante en las poblaciones de *P.lunatus* es su habilidad para mantener reservas de sus semillas en el suelo. Estos bancos de semillas permanecen viables uno o más años después de su diseminación (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998). Las semillas dependen de una estación seca (poca humedad y altas temperaturas) para inducir su dormancia. Mientras que la germinación se da durante el mes de mayo, con el inicio de la estación lluviosa (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998).

La supervivencia entre las poblaciones se ve afectada por procesos estocásticos y antropogénicos. En un monitoreo de tres años (1992-1995) se determinó la presencia de 450 poblaciones en el Valle Central de Costa Rica (Rocha *et al.* 1997). Luego del primer año únicamente 244 poblaciones permanecieron activas al final de dicho período (65 poblaciones fueron eliminadas debido a que no cumplían con el requisito de 500 m de lejanía entre sí). El resto (141 poblaciones) desaparecieron debido a cambios en las prácticas agrícolas y a la urbanización (Rocha *et al.* 1997). Un censo posterior realizado entre 1994-1995, determinó una pérdida de 82 de las 244 poblaciones activas en el censo anterior, y una permanencia de solamente 162 poblaciones. La pérdida de las poblaciones silvestres de *P.lunatus* se debió a la expansión urbana (49,8%) y el manejo intensivo de los cultivos agrícolas (39,5%). Sin embargo se detectó la recolonización de 33 nuevas poblaciones (Rocha *et al.* 1997).

Este fenómeno de extinción y recolonización de algunas poblaciones puede ser explicado según Slatkin (1977) por dos factores distintos. En primer lugar debido a la deposición previa de propágulos (en este caso bancos de semillas) por parte de la población anteriormente existente. En segundo lugar, debido al intercambio y dispersión de propágulos (semillas) entre las poblaciones. Esto lleva a considerar la existencia de metapoblaciones, las cuales son conglomerados de pequeñas poblaciones con intercambio de individuos entre sí (Rocha *et al.* 1997, Degreef 1998).

En una situación de metapoblaciones, la alteración del hábitat incrementa el riesgo de extinciones locales y reduce la probabilidad de recolonización de la especie, como sucede con las poblaciones de *P.lunatus*. Esto se aplica también cuando el banco de semillas en el suelo es pequeño o el arribo de semillas es escaso (Rocha *et al.* 1997). El frijol Lima depende de este reservorio de semillas para mantener sus poblaciones (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998), y surge como un reservorio de la variabilidad genética original de la población. Debido a que la recolonización de una población no implica su posterior reproducción durante los próximos años, se aumenta el efecto de cuello de botella al perderse parte de la posible variabilidad existente en el banco de semillas con cada período de extinción.

Varios autores han planteado que la dirección y magnitud de un efecto de extinción y recolonización dependen de la función que la deriva génica, el efecto fundador y el flujo génico

o migración, puedan desempeñar sobre la dinámica de las poblaciones (Rocha *et al.* 1997). Sin embargo, y como plantean Gliddon y Goudet (1994), el entendimiento de los procesos de extinción y recolonización en una metapoblación, puede generar predicciones útiles para resolver problemas particulares de conservación (Rocha *et al.* 1997). En el caso de *P.lunatus* aún no ha sido determinado el efecto que tienen estos períodos de "fluctuación", en la diversidad genética de las poblaciones silvestres en el Valle Central de Costa Rica. Este estudio tuvo como principal objetivo determinar el efecto que los períodos de extinción y recolonización tienen sobre la diversidad genética de las poblaciones de *P.lunatus*. Al final de este trabajo se espera haber contribuido con nuevas herramientas que permitan mejorar el manejo y conservación *in situ* de las poblaciones silvestres de frijol Lima en el Valle Central.

## **Metodología**

**Especie estudiada.** El frijol Lima silvestre tiene un hábito trepador y se le considera una especie perenne de vida corta. Típicamente presenta crecimiento indeterminado durante la estación lluviosa. Pero en la estación seca, su tallo lignificado le permite eliminar sus hojas y entrar en latencia en respuesta al desbalance hídrico. Es en este período cuando se da la dispersión de las semillas mediante la apertura explosiva de las vainas (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998, Bi Irié 1999).

Las poblaciones de *P.lunatus* pueden mantener reservas de sus semillas en el suelo (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998). Estos bancos de semillas se han encontrado hasta tres años después de su diseminación (Degreef *et al.* 1997). Las semillas requieren de una estación de poca humedad y altas temperaturas para inducir su dormancia. La germinación de éstas la promueve la entrada de humedad a la semilla durante los primeros meses de la estación lluviosa (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998).

Sus flores son muy similares a las del frijol común (*P.vulgaris*). La planta requiere la visita de algún polinizador para transferir con éxito el polen desde las anteras al estigma de la flor. La especie es autocompatible y la autofecundación es muy común. Sin embargo la tasa de exocruzamiento es importante y puede variar significativamente dentro y entre poblaciones (Maquet *et al.* 1999, Bi Irié 1999).

**Área de estudio.** El estudio fue realizado con poblaciones presentes en el Valle Central de Costa Rica. Este alberga las cuatro principales cabeceras de provincia y la mayoría de la población urbana del país y tradicionalmente a sido una región agrícola cafetalera. Sin embargo en los últimos cincuenta años la región central del país ha experimentado un acelerado crecimiento demográfico el cual ha traído como consecuencia, cambios radicales en el uso de la

tierra y el abandono en las prácticas agrícolas tradicionales (INEC 2001, Dirección General de Estadística y Censos 1953, 1974, 1975, 1987).

Una numerosa cantidad de poblaciones silvestres de frijol Lima se encuentran dispersas en el Valle Central. Estas poblaciones se distribuyen entre los 09°47' y 10°09' de Latitud Norte y 83°50' y 84°30' de Longitud Oeste y entre los 500 a 1800 m.s.n.m. (Maquet *et al.* 1996, Rocha *et al.* 1997, Degreef 1998). Comúnmente se les encuentra en sitios alterados, en las orillas de los caminos, en terrenos baldíos y en sistemas agroforestales tradicionales como los cafetales de sombra. Los cambios en el uso de la tierra en el Valle Central han puesto en riesgo de extinción a la mayoría de poblaciones de *P.lunatus* allí presentes.

**Estudio de las poblaciones.** Con el objetivo de dar seguimiento a las poblaciones de frijol Lima del Valle Central se establecieron seis transectos de muestreo utilizando los caminos vecinales que recorren la región central del país. Inicialmente se contabilizaron 106 poblaciones activas durante un censo realizado en 1994, estas fueron definidas como agrupaciones de individuos separados por no más de 500 metros. A partir de esta fecha y hasta diciembre del 2000 se realizaron conteos mensuales de los individuos en cada una de las 106 poblaciones activas, y se registraron cuántos de estos se encontraban en los siguientes estadios fenológicos: vegetativo, produciendo botones florales, flores maduras, vainas verdes, frutos maduros o dispersando semillas mediante la apertura de las vainas. La información obtenida para cada población se ordenó en forma de ciclos anuales (períodos de 12 meses) de acuerdo con la actividad fenológica de la población. En general se observó que la brotación del follaje y la germinación de nuevas plantas inicia con la entrada de la estación lluviosa durante el mes de mayo mientras que la dispersión de las semillas y pérdida del follaje de las plantas adultas ocurre durante la estación seca (de diciembre a abril).

**Dinámica de extinciones y colonizaciones.** La dinámica de la metapoblación se estudió utilizando modelos de matrices de Lefkovich para describir la variación en el número de poblaciones presentes y el máximo estadio fenológico alcanzado en cada año, por cada una de ellas. Para tal efecto se calcularon, para cada ciclo anual completo, las probabilidades de que los individuos dentro de cada población alcancen un máximo estadio fenológico, dependiendo del máximo estadio fenológico alcanzado por la población durante el año anterior. Se consideraron los cinco períodos comprendidos entre mayo de 1995 y abril del 2000, y se incluyeron todas las 106 poblaciones encontradas en el censo inicial. Los estadios fenológicos registrados en cada población, se simplificaron y sólo fueron considerados los correspondientes a: permanencia en estadio vegetativo, producción de flores, producción y maduración de vainas y dispersión de semillas. Además la extinción local de las poblaciones se consideró como un

estadio adicional. Se utilizó el programa Unified life models (ULM) desarrollado por Legendre y Clobert, (1995) para obtener los parámetros de crecimiento poblacional. Las principales causas de perturbación y extinción local en las poblaciones también fueron registradas y cuantificadas.

**Análisis genético y poblaciones estudiadas.** Con el objetivo de determinar el efecto que ejercen los ciclos de extinción y recolonización sobre la diversidad genética de las poblaciones, se realizó un análisis de esta mediante la técnica de microsatélites. Se utilizaron poblaciones en tres tratamientos demográficos, léase: poblaciones recolonizadas, poblaciones testigos y poblaciones manipuladas. En cada uno de estos grupos de poblaciones, se realizó una comparación de la variación genética presente en los individuos recolectados para diferentes espacios de tiempo. En cada grupo de poblaciones se tomaron muestras al azar de al menos 25 individuos x población x fecha de recolecta. En total, aproximadamente 50 individuos por cada población.

Para el primer grupo (poblaciones recolonizadas) se seleccionaron cuatro poblaciones que sufrieron al menos un período de extinción local y recolonización, y de las cuales se recolectaron semillas en los años anteriores a su extinción. La disponibilidad de semillas previamente recolectadas, determinó la selección de dichas poblaciones. El material recolectado se comparó con muestras de los individuos presentes después de la recolonización de los sitios (recolectados durante el 2000-2001). Para el grupo de poblaciones testigos se utilizó material proveniente de las poblaciones que permanecieron activas desde noviembre de 1994, y para las cuales se tiene información de eventos reproductivos exitosos en cada año. En cada caso se usaron los embriones de las semillas recolectadas durante 1995 y en el año 2001. El tercer grupo de poblaciones (poblaciones manipuladas) consistió en inducir un período de máxima mortalidad en cinco poblaciones con condiciones reproductivas similares a los testigos. Los individuos de estas poblaciones fueron recolectados y cortados en su totalidad durante el último ciclo anual, antes de alcanzar los estadios de maduración de frutos y dispersión de semillas. Para cada población se seleccionó una muestra aleatoria de los individuos presentes antes de la perturbación y se comparó con lo recuperado al año siguiente por la germinación del banco de semillas del suelo.

Con el material recolectado se identificó la variación genética presente en las poblaciones a nivel molecular. El ADN para las reacciones de PCR se obtuvo a partir de material vegetativo (hojas, tallos o embriones de semillas hidratadas). El ADN fue extraído utilizando el protocolo de Lodhi *et al.* (1994), con algunas modificaciones basadas en el protocolo del CIAT para la extracción del ADN del frijol común (González *et al.* 1995). Para las reacciones de PCR se usaron imprimadores diseñados para el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) por Yu *et al.* (2000). Los PCR se llevaron a cabo en un termociclador de calentamiento por aire

"Rapid Cycler" (Idaho Technology). Los productos de las amplificaciones se separaron en un gel de secuenciación de acrilamida-urea al 5% de 39cm, con un campo eléctrico de 55watt (8000 Volt) y a una temperatura de 55°C. Las bandas fueron visualizadas usando el protocolo de tinción de plata para acrilamida (PROMEGA).

Los datos recolectados se analizaron en el programa PopGen32 versión 1.31 desarrollado por Francis Yeh, Rong-cai Yang y Timothy Boyle (1999). Como medidas de la variación genética se calcularon la heterocigosis promedio y el número efectivo de alelos en cada muestra de individuos. El índice de diferenciación entre las poblaciones ( $F_{ST}$ ) dado por Nei (1978) se utilizó como parámetro para determinar el cambio a través del tiempo en la estructura genética de las distintas poblaciones. La capacidad de cada grupo de poblaciones para recuperar y mantener la variación genética que existe a lo largo del tiempo se estimó mediante el número efectivo de migrantes ( $N_e m$ ), el cuál es una medida basada en el calculo de la  $F_{ST}$ . Se realizó una prueba de contingencias ( $\chi^2$ ) basada en el modelo de apareamiento para multiloci mixtos ("multilocus mixed mating model"), con el objeto de determinar el grado de significancia en la variación de las frecuencias alélicas para cada una de las comparaciones realizadas (James *et al.* 1998). En este caso se adaptó la formula en la cual  $D=NG_{ST}(a-1)$ , se sustituyo  $G_{ST}$  por los valores obtenido de  $F_{ST}$ . El número "N" de gametos (polen + óvulos) correspondió al total de alelos presentes en la población comparada a través del tiempo, y "a" el número de alelos distintos presentes en ambas muestras. Los grados de libertad estuvieron dados por  $gl = (a-1)$ .

## Resultados

**Dinámica de extinciones y colonizaciones.** Los resultados de los censos realizados desde 1994 indicaron una disminución de las poblaciones activas en los últimos cinco años (de 106 en 1994 a 77 en el 2000). Algunas de las poblaciones cuyos individuos alcanzaron a producir flores, no llegaron a completar la maduración de los frutos por causa de perturbaciones que afectaron la permanencia de los adultos reproductivos en la población. Únicamente el 66,5% de éstas, lograron en promedio, alcanzar el último estadio fenológico a lo largo de los 6 ciclos anuales muestreados. Pero solamente el 26,4% de las poblaciones lo hicieron en forma consecutiva. En casi todos los ciclos anuales se dio la recolonización de sitios donde las poblaciones originales se habían considerado como extintas, en años anteriores. Durante el periodo de los censos, el 55% de las poblaciones fueron cortadas total o parcialmente, convirtiéndose este tipo de perturbación en la que mayor impacto causó en las poblaciones de frijol Lima. El uso de herbicidas fue el segundo tipo de perturbación en importancia con un 21% de los casos. El reemplazo de los individuos eliminados fue comúnmente observado en periodos menores a los 12 meses. Las poblaciones que en los 6 años de muestreo mantuvieron

tamaños promedio menores a 20 individuos presentaron una mayor probabilidad de sufrir extinciones permanentes ( $p=0,93$ ). Mientras que, al aumentar el tamaño promedio de las poblaciones se observó una disminución en el riesgo de extinción de esta ( $p=0,36$  entre 20 y 30 individuos y  $p<0,075$  con tamaños promedio mayores a los 50 individuos). Las poblaciones de tamaños promedio superiores a los 10 individuos, mostraron también, una mayor tasa de recolonización de los sitios que sufrieron extinciones locales previas.

Varios posibles escenarios fueron modelados utilizando como base la información recolectada durante los años de muestreo. Para ello se varió el vector inicial, es decir el número de poblaciones iniciales para cada estadio fenológico. Como primeros escenarios, se consideraron como vectores iniciales las condiciones demográficas registradas durante 1995, las registradas durante el año 2000 y el promedio de los cinco años de censos. Los resultados del modelo indicaron un aumento en el número de las poblaciones que permanecerían vegetativas o que solamente producirían flores. Aquellas que completan la dispersión de semillas disminuyeron de forma acelerada. Consecuentemente, el número de las poblaciones extintas aumentó hasta alcanzar su máximo en la generación 15. Para dichos escenarios, la metapoblación llegó a un equilibrio en el cual mantuvo un número constante de poblaciones en cada categoría luego de cierto número de años (aproximadamente 35 poblaciones por estadio). Posteriormente se planteó un escenario cuyo vector inicial fueron las 106 poblaciones censadas en estadio vegetativo. Bajo estas condiciones, se presentó una disminución drástica en el número de poblaciones activas. La metapoblación alcanzó rápidamente un equilibrio, donde el número de poblaciones en cada categoría fue aproximadamente de 10 a 15 poblaciones en cada estadio. Finalmente, se construyeron distintos escenarios en los cuales se mantuvo el mismo número de poblaciones en cuatro de los cinco estadios fenológicos. Para cualquiera de las categorías fenológicas, la ausencia de poblaciones trajo como consecuencia, la reducción en el tamaño final de la metapoblación. Sin embargo la ausencia inicial de poblaciones en el estadio de dispersión de las semillas provocó una drástica disminución en el número final de poblaciones en la metapoblación. La llegada a este estadio, parece ser de gran importancia para garantizar la estabilidad y permanencia de la metapoblación.

**Variación genética en las poblaciones silvestres.** Únicamente 16 poblaciones (41,03% de aquellas que sufrieron extinción local) recolonizaron los sitios en años posteriores. Con respecto a las poblaciones que permanecieron activas durante todo el período de muestreos, sólo 28 (el 41,79%) completaron su ciclo reproductivo durante todos los años. El índice de diferenciación de Nei ( $F_{ST}$ ) para las muestras de poblaciones recolectadas durante el período 1994-1995 fue mayor ( $F_{ST}=0,3419$ ) al observado para las mismas poblaciones recolectadas entre el 2000-2001

( $F_{ST}=0,4202$ ). Este análisis, señaló un aumento de la diferenciación genética entre las poblaciones de frijol Lima, para los dos periodos analizados.

Las poblaciones que presentaron eventos de extinción y recolonización (poblaciones recolonizadas) no conservaron algunos de los alelos presentes en las muestras originales. En algunos casos se dio un cambio total en las variantes observadas pero más frecuentemente se dio una disminución de los alelos menos abundantes. El número efectivo de alelos disminuyó en tres de las cuatro poblaciones analizadas. Se observó una deficiencia de heterocigotos en la mayoría de las muestras tomadas y como consecuencia se presentaron valores positivos en los índices de fijación. La heterocigosis observada no presentó un patrón claro de variación en las poblaciones recolonizadas, mientras que la heterocigosis calculada a partir de las frecuencias alélicas, con base en el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg, tendió a aumentar a lo largo del tiempo. Se observó una disminución en la endogamia (índices de fijación) en las poblaciones que colonizaron los sitios posterior su recolonización, en comparación con las muestras tomadas antes del periodo de extinción local. Mientras que la diferenciación genética dentro de las poblaciones y a través del tiempo, alcanzó valores más altos que el resto de tratamientos ( $F_{ST}$  promedio  $>0,27$ ). Se observó además una disminución en la capacidad de las poblaciones para conservar estable la diversidad presente dentro de las mismas ( $N_e m$  promedio =  $2,0 \pm 2,6$ ). El poco éxito en los eventos reproductivos de estas poblaciones puede explicar los valores observados para los índices de  $F_{ST}$  y  $N_e m$ .

En el grupo de poblaciones testigo los resultados mostraron variaciones aleatorias en las frecuencias alélicas (posible consecuencia de la deriva genética), sin embargo se mantuvieron en la mayoría de los casos los mismos alelos en las poblaciones a lo largo del tiempo. El número efectivo de alelos permaneció constante en dos de las poblaciones testigo. Este disminuyó en la población E25 mientras que tendió a aumentar en la población J11, acorde con los cambios registrados en el número de alelos de estas poblaciones. Los índices de fijación mostraron una deficiencia en el número de heterocigotos presentes en la mayoría de las muestras tomadas. Tanto la heterocigosis observada como la heterocigosis calculada siguiendo el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg disminuyeron en las poblaciones a lo largo del tiempo. La endogamia en las poblaciones testigo aumentó al comparar las muestras correspondientes al inicio del periodo de muestreos con las recolectadas al final del periodo de estudio. Los índices de diferenciación genética en este grupo de poblaciones fueron menores a los observados en las poblaciones recolonizadas ( $F_{ST}$  promedio  $\ll 0,075$ ) sugiriendo una baja tasa de cambio en la diversidad genética interna (número de alelos y heterocigosis). El flujo de genes en las poblaciones testigo superó los valores obtenidos para las poblaciones recolonizadas ( $N_e m$  promedio =  $4,3 \pm 2,9$ ). Las poblaciones testigo mantuvieron tamaños efectivos de migrantes dos y hasta nueve veces mayores a los presentados por poblaciones

que atravesaron por perturbaciones constantes (poblaciones recolonizadas). Sin embargo el análisis de contingencias indicó diferencias significativas en las frecuencias de los alelos presentes durante el periodo estudiado.

Las poblaciones manipuladas presentaron cambios en la frecuencia de los alelos presentes antes y después de la manipulación, pero éstos no siguieron ningún patrón en particular. Algunas variantes poco abundantes en la recolecta inicial no se reportaron en las muestras posteriores. Varias poblaciones mantuvieron los mismos alelos mientras que en una de ellas se dio tanto la pérdida como la aparición de nuevas variantes. El número efectivo de alelos no presentó cambios significativos al comparar las muestras recolectadas antes y después de la perturbación. Los índices de fijación en la mayoría de las muestras colectadas fueron mayores a cero, éstos tendieron a aumentar en tres de las cinco poblaciones en las muestras posteriores a la manipulación. Se observó una reducción en el número de heterocigotos (heterocigosis observada y heterocigosis esperada) en las muestras colectadas posterior a la recuperación de las poblaciones. El banco de semillas en estas poblaciones recuperó la mayoría de los alelos presentes en las poblaciones anteriores a la perturbación. La diferenciación genética en ambas muestras tomadas fue menor a la presentada por el resto de los grupos de poblaciones analizados ( $F_{ST}$  promedio  $\ll 0,02$ ). El flujo de genes (número efectivo de migrantes) en estas poblaciones fue mayor al presentado por el resto de los grupos de poblaciones, pero el mismo se mostró muy variable ( $N_e m$  promedio =  $18,0 \pm 12,1$ ). Como consecuencia no se dieron cambios estadísticamente significativos en la estructura genética de las poblaciones manipuladas. La prueba de contingencias realizada confirmó la eficiencia del banco de semillas como reservorio de la variabilidad genética interna de la población.

## **Discusión**

**Dinámica de extinciones y colonizaciones.** Los datos obtenidos han permitido identificar los principales factores que afectan la viabilidad y demografía de la especie en la región central del país. El manejo que se le da a la tierra, principalmente la limpieza manual de las malezas y el uso de herbicidas son los principales factores que han puesto en peligro de extinción las poblaciones de frijol Lima. Se encontró una relación inversa entre el tamaño promedio de las poblaciones y la frecuencia con que estas se vieron afectadas por las extinciones locales. Estudios han demostrado que el tiempo de permanencia de las poblaciones en un sistema de metapoblaciones, incrementa cuando se consideran aquellas de mayor tamaño (Hanski *et al.* 1996). Según esto, las poblaciones pequeñas o sometidas a continuas perturbaciones que afectan su reproducción o estabilidad, poseen mayores tasas de extinción (Hanski *et al.* 1996). La tasa de migración entre las poblaciones (en este caso la dispersión de semillas) constituye

también un factor importante al considerar la capacidad de recuperación de aquellas poblaciones extintas y la colonización de nuevos sitios (Hanski 1991, Hansson 1991, Cain *et al.* 2000). Anteriores estudios sugieren la frecuencia de procesos de fusión y fisión en las poblaciones de *P. lunatus* del Valle Central (Rocha *et al.* 1997). Gracias a su asociación a sitios alterados y sistemas agrícolas tradicionales (en un momento parte dominante de paisaje del Valle Central) las poblaciones de frijol Lima posiblemente fueron más numerosas y de mayor tamaño con respecto al presente. El riesgo de extinción en las poblaciones estudiadas de frijol Lima, no puede predecirse únicamente por el tamaño que mantienen estas. Si bien las poblaciones con menor número de individuos tuvieron mayor probabilidad de extinción, se debe tomar en cuenta que el efecto del tamaño de la población no puede ser separado de la frecuencia con que su hábitat es alterado (Rocha *et al.* 1997 y 2002).

Recientes consideraciones reconocen la heterogeneidad de la matriz en la cual se establece la metapoblación. La persistencia de una metapoblación dependerá no sólo del desarrollo local de las poblaciones individuales, si no también del panorama completo de cuántos nuevos parches habitables son colonizados en cada período reproductivo, comparado con el número de poblaciones que llegan a extinguirse (Harding y McNamara 2002). Variaciones en las tasas de extinción o inestabilidad en la dinámica a nivel local de las poblaciones, pueden ser consecuentes con la estabilidad, persistencia o coexistencia de la metapoblación (Hanski 1991, Hastings 1991, Hanski *et al.* 1996). Al utilizar un modelo de matrices para proyectar el comportamiento de la metapoblación se está considerando el paso de una transición a otra como un evento que depende de una probabilidad dada por las condiciones a la que esta se encuentra sometida. La consideración de los distintos escenarios para las poblaciones de frijol Lima del Valle Central, permiten predecir los que sucedería en la metapoblación si se mantienen las mismas condiciones dadas por el promedio de estos cinco años de censos. El comportamiento observado refleja una compleja dinámica poblacional y resalta la importancia de las poblaciones que logran completar su ciclo reproductivo, en mantener la estabilidad demográfica de la especie.

La colonización de nuevos sitios y el aumento en el número de poblaciones a partir de las 106 iniciales resultó ser inesperado, considerando el historial registrado durante el período de censos. La consideración de la existencia de bancos de semillas en sitios anteriormente ocupados por poblaciones extintas, la capacidad de dispersión de estas a largas distancias por agentes dispersores, o ambos, debe ser considerada con mayor cuidado en futuras estrategias de conservación. Hasta el momento la principal fuente de reclutamiento de individuos en periodos desfavorables se da mediante la previa deposición de un banco de semillas remanente en el suelo, el cuál puede permanecer dormante por hasta 3 años (Degreef 1998). No obstante los datos recolectados por el autor indican que el 70% a 84% de las semillas germinan en el

primer año luego de ser dispersadas y que al tercer año habrán germinado el 99% de las semillas depositadas (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998). Las consideraciones realizadas sobre el banco de semillas indican que este estabiliza la dinámica poblacional y ayuda a mantener un equilibrio cuando se dan oscilaciones en el tamaño de la población. Los resultados obtenidos por Degreef *et al.* (1997) indicaron que las poblaciones silvestres de *P. lunatus* en el Valle Central, se caracterizan por una alta fecundidad y a su vez por una alta mortalidad. Su estrategia constituye la de una especie oportunista con una gran capacidad de colonización de sitios poco favorables (Degreef *et al.* 1997). La especie posee un alto componente de migración de los individuos a través del tiempo; más que la colonización a largas distancias, considerando el conocimiento acumulado con respecto a la dispersión de las semillas. Esta es capaz de prolongar su permanencia en un sitio gracias a la deposición de un banco de semillas, el que permite la recolonización del mismo, luego de atravesar períodos de alta mortalidad de individuos.

**Variación genética en las poblaciones silvestres.** Este estudio describe cambios en la variación genética que acontecen en las poblaciones silvestres de *Phaseolus lunatus* en el Valle Central de Costa Rica. El objetivo fue evaluar el impacto que sobre ésta ejerce la incidencia de perturbaciones que afectan la reproducción y dinámica poblacional. La información demográfica de la especie reveló una estructura de metapoblaciones (Rocha *et al.* 1997, Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998, Rocha *et al.* 2002). Los resultados presentados en este estudio indicaron también, una compleja dinámica respecto a la diversidad genética interna de las poblaciones. Esta incluye la pérdida y ganancia de alelos, lo cuál no descarta la posibilidad de intercambio genético entre las poblaciones, ya sea por migración de polen o semillas. Los valores de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) obtenidos para determinar el cambio en la estructura genética de las poblaciones que conforman la metapoblación, coincidieron con los reportados en la literatura para poblaciones de hierbas perennes con sistemas de cruzamiento autógeno o mixto y para especies de plantas anuales, predominantemente autógenas (Hamrick y Godt 1989, Heywood 1991).

La llegada de semillas desde las poblaciones vecinas aumenta el flujo genético entre ellas y puede amortiguar el efecto de las perturbaciones que reducen la reproducción dentro de las mismas (Ebenhard 1991, Cain *et al.* 2000). El grado de significancia de este flujo de genes sobre las poblaciones recientemente colonizadas, dependerá en gran parte, de las tasas relativas con que dichos genes se muevan hacia los hábitat vacíos (colonización) o entre las poblaciones ya establecidas (migración), (Thrall *et al.* 1997).

El análisis de los indicadores utilizados para cuantificar la variación genética en las poblaciones sugiere que tanto la cantidad de las perturbaciones, pero también el tiempo

transcurrido sobre la población, influyen en la dinámica de las frecuencias alélicas y en el número de los alelos presentes. La incidencia de cuellos de botella incrementó en magnitud el cambio que presentaron las poblaciones silvestres de *P. lunatus* en el Valle Central. El trabajo realizado con las poblaciones testigo indicó que el banco de semillas dejado años atrás mantuvo la capacidad de mantener, restaurar o ambas, la estructura genética original. Sin embargo las poblaciones manipuladas señalaron que esa capacidad de restauración del banco de semillas puede ser variable entre las poblaciones y que no se puede descartar el cambio en el número y frecuencia de los alelos presentes a lo largo del tiempo. Este reservorio de genes (banco de semillas) es posiblemente quién con mayor peso garantiza la permanencia de las poblaciones de frijol Lima del Valle Central.

Los cuellos de botella por los que atraviesan las poblaciones demostraron ser una de las principales causas de diferenciación genética y pérdida de variabilidad en las poblaciones de la metapoblación. El aporte de los eventos reproductivos en las poblaciones recolonizadas se reflejó en los valores alcanzados para el índice  $F_{ST}$  de Nei. Los resultados indicaron que la variación genética en las poblaciones que sufren perturbaciones constantes se ve grandemente afectada si la reproducción dentro de las mismas es poca. Muy posiblemente como consecuencia del agotamiento en el banco de semillas del suelo (disminución de su tamaño efectivo), y sumado a esto, la pérdida de variación genética por mortalidad de la población vegetativa. Esto confirma la importancia que tiene el banco de semillas del suelo y la frecuencia de los eventos reproductivos, en el mantenimiento y conservación de la variabilidad genética intrapoblacional.

El aislamiento genético entre las poblaciones (aún no precisado en su totalidad) y el reducido número de individuos característicos de las poblaciones de frijol Lima, sugieren que esas se encuentran cada vez más expuestas a sufrir pérdida de alelos a causa de la deriva genética. Las poblaciones de *Scutellaria montana* estudiadas por Cruzan (2001), confirman los resultados obtenidos en este estudio bajo un contexto ecológico similar. Rocha *et al.* (1997) propuso que las poblaciones de frijol Lima en el Valle Central atraviesan por constantes procesos de extinción, fusión y fisión. Adicionalmente la información demográfica recolectada, demostró que estos procesos son frecuentes y que un número importante de poblaciones no cumple sus ciclos reproductivos.

## Conclusiones

**Dinámica de extinciones y colonizaciones.** La estrategia de expansión que siguen las poblaciones de frijol Lima como metapoblación posee un componente substancial de migración a través del tiempo, por medio de la dormancia de sus semillas. Si el número de poblaciones

que colaboran con la dispersión de nuevos individuos es baja, la capacidad de recolonización de los sitios afectados por perturbaciones frecuentes disminuye.

El modelo aplicado para el Valle Central, no señaló la presencia de un evidente riesgo de extinción local de la especie. Por el contrario, si las condiciones dadas para la región se mantienen sin cambio se debería esperar la colonización de nuevos sitios y el surgimiento de nuevas poblaciones. Aún cuando también aumentará por cada generación el número de poblaciones que permanecerán extintas.

Este estudio confirmó la importancia que tiene el banco de semillas en la recuperación de las poblaciones que atraviesan por perturbaciones constantes. Asimismo la necesidad de permitirle a estas alcanzar los últimos estadios fenológicos (producción y dispersión de semillas) para evitar la reducción en el número de poblaciones presentes en el Valle Central de Costa Rica.

**Variación genética en las poblaciones silvestres.** El papel de la migración (flujo de polen y semillas) debe ser considerado. Principalmente el transporte de semillas a largas distancias. Este estudio evidenció la importancia del banco de semillas del suelo como fuente de colonización y reservorio de la variabilidad genética a lo largo del tiempo, en las poblaciones de *P. lunatus*. Pero más importante evidencia los efectos que sobre la variabilidad genética de las poblaciones de frijol Lima del Valle Central, ejercen los eventos de extinción local y las perturbaciones causantes de mortalidad y bajas tasas de reproducción. En estas poblaciones, el banco de semillas previene la pérdida de variantes genéticas, a pesar de los períodos de alta mortalidad y la ausencia de reproducción.

La información recopilada no permitió determinar si los cambios en las frecuencias alélicas de las poblaciones recolonizadas, fueron causados por la migración de semillas desde las poblaciones vecinas. Principalmente debido a la presencia de los mismos alelos en la mayoría de las poblaciones. Sin embargo la aparición de algunas variantes nuevas, que no se encontraban presentes en las muestras iniciales (poblaciones E17, E38 J11 y E104) no permiten descartar dicha posibilidad.

Los datos recolectados sugieren que la variación genética presente en las poblaciones de *P. lunatus*, objetivo último de su conservación, puede encontrarse en riesgo de reducirse si se combinan los escasos eventos reproductivos con la disminución en el número de individuos que aportan semillas al banco del suelo. Los altos valores de diferenciación genética en el tiempo, son el producto de tamaños efectivos bajos durante los períodos reproductivos.

La disminución en los niveles de heterocigosis, así como los altos índices de fijación presentados por algunas poblaciones sugieren importantes niveles de endogamia. Esta en

conjunto con la deriva genética causada por los frecuentes cuellos de botella, son factores que deben ser considerados para el manejo de la especie.

### **Palabras clave**

Erosión genética, metapoblaciones, microsátélites, dinámica de poblaciones, diversidad genética, poblaciones fluctuantes conservación *in situ*.

### **Director de la Investigación:**

Dr. Oscar J. Rocha Núñez<sup>1</sup>.

Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio". San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

### **Referencias Bibliográficas INTRODUCCIÓN GENERAL**

Baudouin, J.P. 1988. L'amélioration de *Phaseolus lunatus* L. en zones tropicales, Taxonomie, origine et évolution du genre *Phaseolus* et de l'espèce étudiée. Bull. Rech. Agron. Gembloux. 23(3): 237-260.

Baudouin, J.P. 1989. L'amélioration de *Phaseolus lunatus* L. en zones tropicales, Ecologie et physiologie. Bull. Rech. Agron. Gembloux. 24(1), 5-32.

Bi Inié, Zoro. 1999. Variabilité génétique des populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. dans la vallée centrale du Costa Rica et ses implications dans la mise au point d'une stratégie de conservations *in situ*. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Bélgica. 194pp

Cain, M.L., Milligan, B.G. and Strand, A.E. 2000. Long-seed dispersal in plant populations. American Journal of Botany. 87(9):1217-1227.

Cruzan, M. 2001. Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria Montana* (Lamiaceae). Evolution. 55(8): 1569-1580.

Degreef, J. 1998. Développement d'un modèle démographique et applications à la conservations *in situ* au populations sauvages de haricot de Lima (*Phaseolus lunatus* L.) dans la vallée centrale du Costa Rica. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Bélgica. 191pp

Degreef, J., Baudouin, J.P. and Rocha, O.J. 1997. Case studies on breeding systems and consequences for germplasm conservation 2. Demography of wild Lima bean populations in Central Valley of Costa Rica. Genetic Resources and Crop Evolution. 44:429-438.

Dirección General de Estadística y Censos. 1975. Censo de Población de Costa Rica, 22 de mayo de 1950. Ministerio de Hacienda, 2ª ed. Costa Rica. 42-99pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1953. Censo Agropecuario 1950. Ministerio Economía y Hacienda. Costa Rica. 315pp

- Dirección General de Estadística y Censos. 1987. **Censo Agropecuario 1984**. Ministerio de Hacienda, 2ª ed 1975. Costa Rica. 315pp
- Dirección General de Estadística y Censos. 1974. **Censos Nacionales de 1973, Agropecuario**. Ministerio de Hacienda, 2ª ed 1975. Costa Rica. 286pp
- Ebenhard, T. 1991. **Colonization in metapopulations: a review of theory and observations**. Biological Journal of the Linnean Society. 42:105-121
- Evans, L.T. 1993. **Crop Evolution, Adaptation and Yield**. Cambridge University Press. 500pp (62-112)
- Ford-Lloyd, B. and Jackson, M. 1986. **Plant Genetic Resources**. Edward Arnold Pub. Great Britain. 149 pp
- Frankel, O.H., Brown, A.H.D. and Burdon, J.J. 1995. **The Conservations of Plant Biodiversity**. Cambridge University Press. 299pp.
- Gillman, M. 1997. **Plant population ecology**. En: Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V. and Hawkes, J.G. 1997. **Plant genetic conservation: the *in situ* approach**. Chapman and Hall. E.E.U.U. pp114-131.
- González, D.O., Palacios, N., Gallego, C. y Tohme, J. 1995. **Protocolos para Marcadores Moleculares, Unidad de Investigación en Biotecnología**. Centro de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 81pp
- Guarino, L., Rao, V.R. and Reid, R. 1995. **Collecting Plant genetic Resources**. CAB International. Wallingford. 748 pp
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. 1989. **Allozyme diversity in plant species**. En: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. and Weir, B.S. 1989. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**. Sinauer Associates Inc. pp43-63.
- Hanski, I. 1991. **Single-species metapopulation dynamics: concepts, models and observations**. Biological Journal of the Linnean Society. 42:17-38.
- Hanski, I., Mielane, A. and Gyllemer, M. 1996. **Minimum variable metapopulation size**. The American Naturalist. 147(4):527-541.
- Hansson, L. 1991. **Dispersal and connectivity in metapopulations**. Biological Journal of the Linnean Society. 42:89-103.
- Harding, K.C. and McNamara, J.M. 2002. **A unifying framework for metapopulation dynamic**. The American Naturalist. 160(2): 173-185.
- Hastings, A. 1991. **Structure models of metapopulation dynamics**. Biological Journal of the Linnean Society. 42:57-71.
- Heywood, J.S. 1991. **Spatial analysis of genetic variation in plant populations**. Annu. Rev. Ecol. Syst. 22: 335-355.
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) 2001. **IX Censo Nacional de Población y Vivienda, Resultados Generales, Costa Rica agosto 2001**. INEC. 80pp
- James, T., Vege, S. Aldrich, P. and Hamrick, J.L. 1998. **Mating Systems of Three Tropical Dry Forest Tree Species**. Biotropica. 30(4): 587-594.
- Kaplan, L. 1973. **Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*) from an Intermontane Peruvian Valley**. Science. vol: 179. paj 76-77.
- Legendre, S. and Clobert, J. 1995. **ULM, a software for conservation and evolutionary biology**. Journal of Applied Statistics. 22, 817-834.

- Loehn, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1994. **A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and vitis species.** Plant Molecular Biology Reporter. 12 (1): 6-13.
- Maquet, A., Vekemans, X. and Baudoin, J.P. 1999. **Phylogenetics study on wild allies of Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin.** Plant systematics and evolution. 218: 43-54.
- Maquet, A., Zoro Bi, I., Rocha, O.J. and Baudoin, J.P. 1996. **Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation 1. Isoenzyme diversity in wild Lima bean populations in central Costa Rica.** Genetic Resources and Crop Evolution. 43: 309-318.
- Persal, D.M. 1992. **The origins of plant cultivations in South America.** En Cowan, W.C. and Watson, P.J. 1992. **The origins of agriculture; an international perspective.** Smithsonian Institution Press. Washington. 224pp (173-205)
- Peter, C.S., Cohen, J.I. and Janczewski, D. 1993. **Perspectives on Biodiversity: case studies of genetic resources conservation and development.** AAAS Press. Washington. 245pp.
- Prack, R.B. 1998. **Essentials of conservation Biology.** 2° ed. Sinauer Assoc. E.E.U.U. 660pp (378-383)
- Rocha J.O., Macaya, G. and Baudoin, J.P. 1997. **Causes of local extinction and recolonization determined by 3 year of monitoring wild populations of *Phaseolus lunatus* L. in the Central Valley of Costa Rica.** Plant Genetics Resources Newsletter. 112: 44-48
- Rocha O.J., Degreef, J., Barrantes, D., Castro, E., Macaya, G. and Guarino, L. 2002. **Metapopulation dynamic of Lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica.** En: M.M. Engels, J. Patanatha Rao, V., H.D. Brown, A. and Jackson, M.T. 2002. **Managing plant genetic diversity.** CABI Publishing. (IPGRI) Italy. pp205-215.
- Smith Bruce D. 1995. **The origins of agriculture in the Americas.** Evolutionary anthropology. 3: 174-184
- Titral P.H., Richards, C.M., McCauley, D.E. and Antonovics, J. 1997. **Metapopulation Collapse: The consequences of limited gene-flow in spatially structures populations.** En: Bascompte, J. and Solé, R.V. 1997. **Modeling Spatiotemporal Dynamics in Ecology.** Edit Landes Bioscience. pp79-100
- Vargas E.M., Macaya, G., Baudoin, J.P. and Rocha, O.J. 2000. **Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation: 3. Electrophoretic mobility of phaseolins in wild populations of lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the central valley of Costa Rica.** Genetic Resources and crop evolution. 00: 1-12.
- Vargas Barrantes, E.M. 1997. **Variación morfológica y bioquímica en poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) del Valle Central de Costa Rica.** Tesis para optar por el grado de Magister en Biología. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Costa Rica. 90pp.
- Wu, K. Park, S.J., Poysa, V. and Gepts, P. 2000. **Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** The Journal of Heredity. 91(6): 429-434.

## Lista de Cuadros

Título

página

### Primera Parte

Dinámica de extinciones locales y colonización de poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Central de Costa Rica

**Cuadro 1**.....07  
Poblaciones activas de *Phaseolus lunatus* durante los ciclos de sucesión realizados a partir de noviembre de 1994. Se indica el número de poblaciones y el máximo estadio fenológico alcanzado durante cada ciclo anual.

### Segunda Parte

Efecto de las extinciones locales sobre la estructura genética de poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Centra de Costa Rica

**Cuadro 1**.....26  
Poblaciones activas de *Phaseolus lunatus* durante los ciclos anuales sucedidos a partir de noviembre de 1994. Resumen de eventos reproductivos, extinciones y recolonizaciones (Tomado de Barrantes 2003).

**Cuadro 2**.....28  
Poblaciones estudiadas para cada uno de los tratamientos. Se muestra la ubicación geográfica, altitud y transecto de muestreo al cual pertenece (Rocha *et al.* 1997).

**Cuadro 3**.....30  
Indicadores de microsatélites (SSR) utilizados en las poblaciones de *P.lunatus*.

**Cuadro 4**.....32  
Frecuencias alélicas y número de individuos amplificados para cada locus (n) en las poblaciones recolonizadas. Se resaltan los loci que presentaron desequilibrio de Hardy-Weinberg (\*\*= $P < 0,05$ ).

**Cuadro 5**.....33  
Descriptores de la variación genética (promedio y error estándar) para las poblaciones que presentaron ciclos de extinción y recolonización. Los valores presentados corresponden a:  $n_e$  = número efectivo de alelos, Obs\_Het = heterocigosis observada, Exp\_Het = heterocigosis esperada según el cálculo de las frecuencias alélicas y  $f$  = índice de fijación o endogamia obtenido mediante la formula:  $(H_e - H_o) / H_e$ .

<b>Cuadro 6</b> .....	34
Estimación de la diferenciación genética intra-poblacional para las poblaciones recolonizadas. Estadísticas F y flujo genético ( $N_e m$ ) calculado a partir del índice de diferenciación de Nei (1978).	
<b>Cuadro 7</b> .....	35
Valores de $\chi^2$ para el análisis de contingencia correspondiente a los cambios en las frecuencias alélicas para cada locus, en las poblaciones recolonizadas. Se indica en cuales casos la variación fue significativa.	
<b>Cuadro 8</b> .....	36
Frecuencias alélicas y número de individuos amplificados para cada locus (n) en las poblaciones testigo. Se resaltan los loci que presentaron desequilibrio de Hardy-Weinberg (**= $P < 0,05$ ).	
<b>Cuadro 9</b> .....	37
Descriptor de la variación genética (promedio y error estándar) para las poblaciones testigo. Los valores presentados corresponden a: $n_e$ = número efectivo de alelos, Obs_Het = heterocigosis observada, Exp_Het = heterocigosis esperada según el cálculo de las frecuencias alélicas y $f$ = índice de fijación o endogamia obtenido mediante la fórmula: $(H_e - H_o) / H_e$ .	
<b>Cuadro 10</b> .....	38
Estimación de la diferenciación genética intra-poblacional para las poblaciones testigo. Estadísticas F y el flujo genético ( $N_e m$ ) calculado a partir del índice de diferenciación de Nei (1978).	
<b>Cuadro 11</b> .....	38
Valores de $\chi^2$ para el análisis de contingencia correspondiente a los cambios en las frecuencias alélicas para cada locus, en las poblaciones testigo. Se indica en cuales casos la variación fue significativa.	
<b>Cuadro 12</b> .....	39
Frecuencias alélicas y número de individuos amplificados para cada locus (n) en las poblaciones manipuladas. Se resaltan los loci que presentaron desequilibrio de Hardy-Weinberg (**= $P < 0,05$ ).	
<b>Cuadro 13</b> .....	40
Descriptor de la variación genética (se indica el promedio y error estándar) para las poblaciones manipuladas. Los valores presentados corresponden a: $n_e$ = número efectivo de alelos, Obs_Het = heterocigosis observada, Exp_Het = heterocigosis esperada según el cálculo de las frecuencias alélicas y $f$ = índice de fijación o endogamia por deficiencia de heterocigotos calculado según: $(H_e - H_o) / H_e$ .	
<b>Cuadro 14</b> .....	42
Estimación de la diferenciación genética intra-poblacional para las poblaciones manipuladas. Estadísticas F y el flujo genético ( $N_e m$ ) calculado a partir del índice de diferenciación de Nei (1978).	

<b>Cuadro 15.....</b>	<b>43</b>
Valores de $\chi^2$ para el análisis de contingencia correspondiente a los cambios en las frecuencias alélicas para cada locus, en las poblaciones manipuladas. Se indica en cuales casos la variación fue significativa.	

## Lista de Figuras

Título

página

### Primera Parte

Dinámica de extinciones locales y colonización de poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Central de Costa Rica

<b>Figura 1</b> .....	<b>06</b>
Distribución de los transectos de muestreo dentro del área del Valle Central de Costa Rica.	
<b>Figura 2</b> .....	<b>07</b>
Posibles transiciones para la dinámica de metapoblaciones.	
<b>Figura 3</b> .....	<b>08</b>
Tipos de perturbaciones observados en las poblaciones de frijol Lima.	
<b>Figura 4</b> .....	<b>09</b>
Poblaciones afectadas según el tipo de perturbación documentada durante los cinco ciclos anuales de censos.	
<b>Figura 5</b> .....	<b>09</b>
Distribución de tamaños promedio de las poblaciones de frijol Lima. Se incluyen las poblaciones extintas y las recolonizaciones.	
<b>Figura 6</b> .....	<b>10</b>
Probabilidades de transición estimadas para los estadios fenológicos analizados (E = población extinta, V = población vegetativa, Fl = flores, Fr = frutos, S = semillas).	
<b>Figura 7</b> .....	<b>11</b>
Simulación de la dinámica de metapoblaciones considerando a las 90 poblaciones activas durante 1995, como la metapoblación inicial. Las líneas indican el número de poblaciones presentes para cada estadio fenológico.	
<b>Figura 8</b> .....	<b>12</b>
Simulación de la dinámica de metapoblaciones utilizando como vector inicial los datos colectados durante el último periodo de censos en el año 2000. Las líneas indican el número de poblaciones presentes para cada estadio fenológico.	

**Figura 9**.....13  
**Simulación de la dinámica de metapoblaciones** asumiendo en estado vegetativo a las 106 poblaciones, como la metapoblación inicial. Las líneas indican el número de poblaciones presentes para cada estadio fenológico.

**Figura 10**.....14  
**Escenarios hipotéticos** que suponen: (A) igual número de poblaciones en todos los estadios fenológicos, (B) ausencia de poblaciones extintas en la metapoblación inicial, (C) ausencia de poblaciones en cualquier estadio fenológico intermedio y (D) la ausencia de poblaciones dispersoras de semillas en la metapoblación inicial.

## **Segunda Parte**

**Efecto de las extinciones locales** sobre la estructura genética de poblaciones silvestres de frijol Lina (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Central de Costa Rica

**Figura 1**.....29  
**Mapa de estudio.** Se indica la ubicación de las poblaciones estudiadas y el grupo al cuál pertenece cada una de ellas.

## **Apéndice 1**

**Figura 1**.....52  
**Eventos reproductivos** en las poblaciones recolonizadas. Las líneas punteadas corresponden a los periodos de inactividad (extinción local) de la población.

## Dinámica de extinciones locales y colonización de poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Central de Costa Rica

Barrantes A, Daniel<sup>1</sup> Rocha, O. J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio". San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

### Resumen

En Costa Rica está presente el frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) en numerosas poblaciones silvestres, distribuidas en distintas regiones del país. En el Valle Central de Costa Rica, éstas poblaciones se encuentran ubicadas principalmente a orillas de caminos, plantaciones tradicionales de café y ocasionalmente en zonas urbanas. Debido a su potencial como fuente de recursos fitogenéticos, desde 1994 se ha dado seguimiento a 106 poblaciones silvestres de esta especie en el Valle Central. En el presente trabajo se evaluó el número de poblaciones activas al final de cada período reproductivo y el máximo estadio fenológico. Se señalaron las causas principales de extinción local y la frecuencia con que las perturbaciones afectan a estas poblaciones. La dinámica de las poblaciones de frijol Lima como una metapoblación fue modelada utilizando matrices de Lefkovich. Se demostró que las poblaciones que logran completar su ciclo reproductivo son indispensables para mantener estable el tamaño de la metapoblación. Estas también colaboran en la colonización de nuevos hábitat y en el rescate de poblaciones extintas por medio de la dispersión y renovación de bancos de semillas. Se discute la importancia de estos resultados en el desarrollo de estrategias para la conservación *in situ* de este recurso fitogenético.

**Palabras clave:** *Phaseolus lunatus*, frijol Lima, metapoblaciones, extinciones locales matriz poblacional.

### Introducción

El concepto de metapoblaciones se refiere a un conjunto de pequeñas poblaciones separadas en el espacio pero sometidas a una dinámica en común (Hanski 1991, Hansson 1994, Husban y C.H. Barrett 1996, Thrall *et al.* 1997). Este concepto ha sido utilizado para explicar la presencia continua de procesos de extinción y recolonización de una especie en

sitios que representan hábitat temporales (Hastings 1991, McCauley 1993, Hastings y Harrison 1994, Hanski *et al.* 1996, Quintana-Ascencio y Menges 1996). Metapoblaciones naturales de plantas ocurren en distintos hábitat como estadíos de sucesión temprana, claros que resultan de la caída de árboles y sitios sometidos a incendios o inundaciones frecuentes (Quintana-Ascencio y Menges 1996, Gillman 1997). De igual manera, la creación de ambientes artificiales, producto de la intervención humana, puede crear nuevos nichos y favorecer o poner en peligro la colonización por parte de especies silvestres. Este podría ser el caso de áreas con un manejo intensivo del suelo en sistemas agrícolas y agroforestales, los cambios en el uso de la tierra, el abandono de prácticas agrícolas tradicionales y el desarrollo urbano (Rocha *et al.* 1997). Varios autores han propuesto que para cada hábitat potencialmente ocupado, se establece un balance entre las tasas de migración de individuos desde o hacia poblaciones cercanas y la extinción local de la especie a causa de perturbaciones que afectan su establecimiento, su permanencia o ambas (Ebenhard 1991, Hess 1996a).

Algunos autores sugieren que el riesgo de extinción local difiere según la especie considerada y entre poblaciones de la misma especie (Stöcklin y Fischer 1999). Distintos factores demográficos han sido considerados en el estudio de los procesos de extinción dentro de cada población local. Entre estos se incluyen la variación en el tamaño de la población y su capacidad para reclutar nuevos individuos durante períodos de abundancia y escasez de recursos (Hansson 1991, Hanski *et al.* 1996, Husband y Barrett 1996). Asimismo, se ha examinado el efecto de la pérdida de hábitat a causa de factores externos a la población y la capacidad de la especie para colonizar nuevos sitios temporalmente disponibles (Quintana-Ascencio y Menges 1996). Otro factor investigado es el incremento en las tasas de mortalidad y en los procesos de extinción local, a causa de la introducción de especies invasoras, depredadores o enfermedades (Hess 1996b). En general, este tipo de trabajos demuestra la utilidad de los procesos demográficos para el desarrollo de estrategias de conservación y el análisis de los efectos de la fragmentación en los hábitat naturales.

Variaciones en el tamaño de las poblaciones y en el aislamiento de los fragmentos de hábitat pueden influir en el tamaño efectivo de las poblaciones (Hansson 1991, McCauley 1993, Ellstrand y Elam 1993). Varios autores han propuesto que algunos procesos demográficos relacionados con el tamaño de las poblaciones pueden incrementar el efecto de la deriva genética y conducir al aislamiento y la diferenciación genética entre estas (Ellstrand y Elam 1993, Hastings y Harrison 1994, Thrall *et al.* 1997). En general las poblaciones pequeñas o que fluctúan en tamaño presentan mayores tasas de endogamia y riesgo de extinción que las poblaciones grandes. La migración y el flujo genético entre poblaciones se consideran inversamente proporcionales a la distancia entre estas y pueden ser determinantes en cuanto a la estabilidad de las mismas (Hastings 1991, Hansson 1991, Ebenhard 1991, McCauley 1993,

Hastings y Harrison 1994, Thrall *et al.* 1997). Además, la cantidad de perturbaciones y cuellos de botella a los que se encuentra sometida la población reducen su tamaño efectivo y su capacidad de reclutamiento de nuevos individuos. La alteración del equilibrio entre estos factores (la colonización o migración de individuos y la cantidad de perturbaciones o cuellos de botella a los que se ve sometida la metapoblación), puede poner en peligro la estabilidad de las poblaciones e inclinar la balanza hacia la extinción local de la especie (Hastings 1991, Hastings y Harrison 1994, Thrall *et al.* 1997).

Debido a que las plantas son organismos sésiles, la eficiencia de cada especie para colonizar parches disponibles dependerá de su tasa de dispersión de semillas, así como de su capacidad para soportar perturbaciones frecuentes. Esta última a su vez, dependerá de la plasticidad ecológica de las poblaciones, de la presencia de bancos de semillas o ambas. Estos factores son determinantes para evitar la extinción de la totalidad de las poblaciones que componen la metapoblación (Loveless y Hamrick 1984, Ebenhard 1991, Hansson 1991, Kalisz y McPeck 1993, Husband y Barrett 1996). Sin embargo, la relación entre la capacidad de dispersar semillas a larga distancia o de mantener bancos de reserva en el suelo, con la dinámica de extinción y recolonización de las especies, aún no es clara (Kalisz y McPeck 1993, Cain *et al.* 2000). Se ha tratado de dilucidar cuáles son las consecuencias reales que acarrearán el aislamiento espacial y la fragmentación del hábitat, en relación con el aumento o la disminución en el tamaño de la metapoblación (Hastings 1991, Husband y Barrett 1996, Thrall *et al.* 1997). En general, pocos estudios han examinado la forma en que se organizan regionalmente las metapoblaciones en plantas, y cómo son afectados los procesos de extinción y recolonización dentro de estas por los procesos ecológicos antes citados (Husband y Barrett 1996).

Numerosas poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) se encuentran distribuidas de manera natural a lo largo del Valle Central de Costa Rica. Estas se asocian a regiones alteradas tales como terrenos agrícolas, pastizales e incluso algunas están presentes en zonas urbanas (Degreef *et al.* 1997, Rocha *et al.* 1997, Degreef 1998). No obstante se las encuentra con mayor frecuencia asociadas a plantaciones tradicionales de café de sombra, un sistema agroforestal caracterizado por contener una mezcla de diversos árboles de sombra y varias especies del género *Musa*. El manejo que se le da a este tipo de plantaciones es menos intenso y no requiere el uso constante de agroquímicos para la eliminación de malezas, en comparación a las plantaciones no tradicionales a pleno sol (Rocha *et al.* 1997). Sin embargo se ha demostrado que, como consecuencia del cambio en el manejo de las plantaciones de café, en el uso de la tierra y en el desarrollo urbano; las poblaciones de frijol Lima en el Valle Central han experimentado fragmentación, extinción local y en algunos casos se ha dado la recolonización de sitios no ocupados. En este estudio se describe la estructura y dinámica de la

metapoblación de frijol Lima presente en el Valle Central de Costa Rica. Para ello se utilizó un modelo de matrices de Lefkovitch en el cuál se incorporan distintos estados fenológicos por los cuales atraviesan las poblaciones. Adicionalmente se realizó una exploración de las principales causas de inestabilidad que llevan a la extinción local de las poblaciones de frijol Lima.

## Metodología

**Especie estudiada.** El frijol Lima silvestre tiene un hábito trepador y se le considera una especie perenne de vida corta. Típicamente presenta crecimiento indeterminado durante la estación lluviosa. Pero en la estación seca su tallo lignificado le permite eliminar sus hojas y entrar en latencia en respuesta al desbalance hídrico. En este período se da la dispersión de semillas mediante la apertura explosiva de las vainas (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998, Bi Irié 1999).

Una característica de las poblaciones de *P.lunatus* es su habilidad para mantener reservas de semillas en el suelo (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998). Estos bancos de semillas se han encontrado hasta tres años después de su diseminación (Degreef *et al.* 1997). Las semillas requieren de una estación seca (poca humedad y altas temperaturas) para inducir su dormancia, la cual les permite permanecer latentes en el suelo. Mientras que la entrada de humedad a través del micrópilo promueve su germinación (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998, Degreef *et al.* 2002).

Las flores son muy similares a las del frijol común (*P.vulgaris*) se presentan en pseudo-racimos. La planta requiere la visita de algún polinizador para transferir exitosamente el polen de las anteras al estigma de la flor. La especie es autocompatible y la autofecundación es muy común. Sin embargo, la tasa de exocruzamiento es importante y puede variar significativamente dentro y entre poblaciones (Maquet *et al.* 1999, Bi Irié 1999).

**Área de estudio.** Una numerosa cantidad de poblaciones silvestres de frijol Lima se encuentran dispersas en el Valle Central. Estas se ubican entre los 09°47' y 10°09' latitud Norte y entre los 83°50' y 84°30' de longitud Oeste (Maquet *et al.* 1996, Rocha *et al.* 1997, Degreef 1998). Su distribución altitudinal oscila entre los 500 a 1800 m.s.n.m. Se les encuentra asociadas a sitios alterados, orillas de caminos, terrenos baldíos y sistemas agroforestales tradicionales como los cafetales de sombra. El Valle Central o Depresión Tectónica Central alberga las cuatro principales cabeceras de provincia y la mayoría de la población urbana del país. Tradicionalmente este se ha desarrollado como una región agrícola cafetalera, sin embargo en los últimos cincuenta años ha experimentado un acelerado crecimiento demográfico (Dirección General de Estadística y Censos 1953, 1974, 1975, 1987, INEC 2001). Esto ha traído como

consecuencia el abandono de las prácticas agrícolas tradicionales y la introducción de cambios radicales en el uso de la tierra. Entre los principales efectos está el paso de cafetales tradicionales de sombra a cafetales de sol, los cuales demandan un mayor uso de agroquímicos en las plantaciones (Rocha *et al.* 1997). Asimismo, gran cantidad de terrenos dedicados a actividades agropecuarias o de vocación forestal, se han convertido en áreas dedicadas al desarrollo urbano habitacional, afectando de manera directa o indirecta el establecimiento de muchas especies naturales (Rocha *et al.* 1997). El cambio de uso de la tierra en el Valle Central ha puesto en riesgo de extinción a la mayoría de poblaciones de *P.lunatus*.

**Estudio de las poblaciones.** Con el fin de estudiar la dinámica de las poblaciones de frijol Lima presentes en el Valle Central de Costa Rica, se consideró como poblaciones diferentes a todos aquellos conglomerados de individuos separados entre sí por al menos 500 metros (Maquet *et al.* 1996, Rocha *et al.* 1997, Rocha *et al.* 2002). Para dar seguimiento a estas, a partir de noviembre de 1994 y hasta diciembre del año 2000, se establecieron seis transectos utilizando los caminos vecinales que recorren la región central del país (Figura 1). Inicialmente se identificaron todas las poblaciones presentes a lo largo de cada transecto encontrándose un total de 106 poblaciones. Los sitios fueron descritos y marcados utilizando un aparato de posicionamiento geográfico o GPS. Posteriormente, se realizaron censos mensuales en todas las poblaciones, se registró el número de individuos en cada población y sus máximos estadios fenológicos. Se reconocieron seis estadios fenológicos que correspondieron a plantas en estado vegetativo, plantas con botones florales, con flores maduras, con vainas verdes, con frutos maduros y plantas en fase de dispersión de semillas por la apertura de vainas. Se procedió a ordenar esta información y la misma fue utilizada para dar seguimiento a cada población e identificar los períodos reproductivos, los de germinación de semillas y la ocurrencia de extinciones locales.

La actividad de las poblaciones fue clasificada y ordenada en forma de ciclos anuales basados en la actividad fenológica de cada una de ellas. Se estableció como punto de partida el mes de mayo de cada año. Esto debido a que la germinación de las semillas presentes en el banco del suelo y la brotación de follaje de plantas en reposo coincide con el inicio de la estación lluviosa en el Valle Central. Mientras que la apertura de vainas y la dispersión de semillas ocurre principalmente durante la estación seca, cuando las plantas adultas pierden su follaje e inician su período de inactividad fenológica.

La dinámica de la metapoblación se estudió utilizando modelos de matrices de Lefkovitch para describir la variación en el número de poblaciones presentes y el máximo estadio fenológico alcanzado en cada año, por cada una de ellas. Para tal efecto se calcularon, para cada ciclo anual completo, las probabilidades de que los individuos dentro de cada

población alcancen un máximo estadio fenológico, dependiendo del máximo estadio fenológico alcanzado por la población durante en el año anterior. Se consideraron los cinco períodos comprendidos entre mayo de 1995 y abril del 2000, y se incluyeron todas las 106 poblaciones encontradas en el censo inicial. Los estadios fenológicos registrados en cada población, se simplificaron y sólo fueron considerados los correspondientes a: permanencia en estadio vegetativo, producción de flores, producción y maduración de vainas y dispersión de semillas. Además la extinción local de la población se consideró como un estadio adicional (Figura 2). Este análisis permite detectar la extinción local de la población o la recolonización de sitios previamente ocupados pero cuyas poblaciones estaban extintas. Para poner a prueba los modelos poblacionales se utilizó el programa ULM (Unified Life Models) desarrollado por Legendre y Clobert, (1995). No fue posible determinar el origen de las recolonizaciones (semillas provenientes del banco del suelo o de poblaciones cercanas).

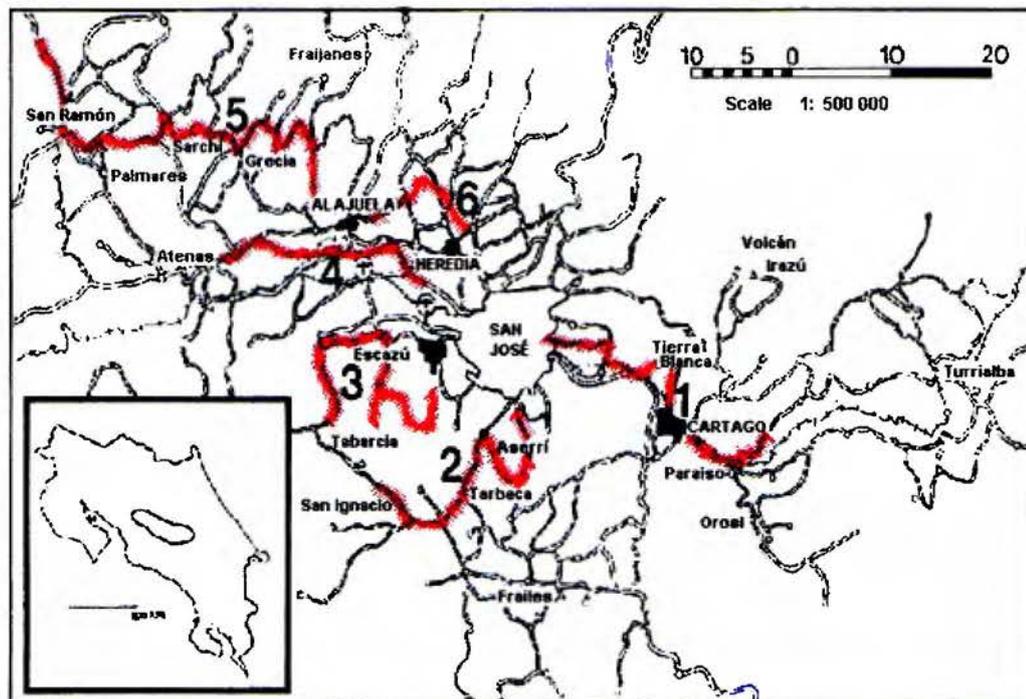


Figura 1. Distribución de los transectos de muestreo dentro del área del Valle Central de Costa Rica.

## Resultados

**Poblaciones presentes, extintas y recolonizaciones.** En el cuadro 1 se muestra un resumen de la demografía y la actividad reproductiva de las 106 poblaciones de *P. lunatus* consideradas en este estudio. En general, puede observarse que existe una disminución del número de poblaciones activas durante los cinco años de observación (de 106 en 1994 a 77 en 2000). El

muestreo también reveló que todos los años se presentaron extinciones locales y en algunos casos hubo eventos de recolonización en los sitios evaluados mediante censos mensuales. Por otro lado, se observó que no todas las poblaciones activas completan su ciclo fenológico. Esto indica, que algunas de las poblaciones cuyos individuos alcanzaron a producir flores no llegaron a completar la maduración de frutos, a causa de perturbaciones locales que afectaron la permanencia de adultos reproductivos en la población. En promedio únicamente el 66,5% de las poblaciones activas lograron alcanzar el último estadio fenológico durante los seis períodos muestreados y solamente el 26,4% lo hicieron en períodos consecutivos. Esto sugiere que las poblaciones de *P.lunatus* en el Valle Central poseen una capacidad variable de mantener, renovar y perpetuar reservorios de semillas en el suelo.



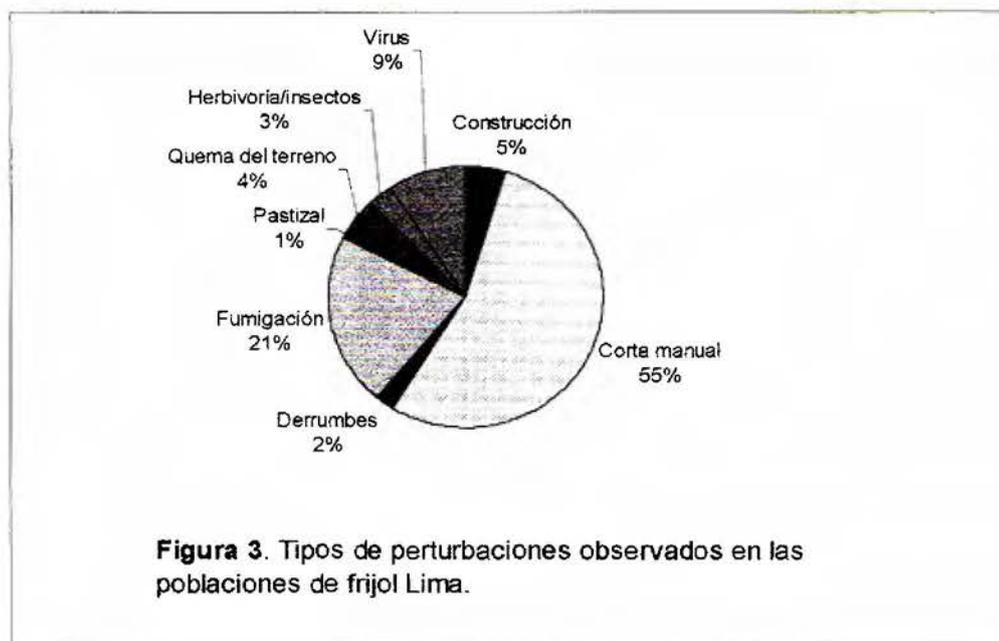
**Figura 2. Posibles transiciones para la dinámica de metapoblaciones.**

Para que un período de extinción sea considerado como tal, la población en cuestión no debió de presentar germinación o actividad vegetativa durante al menos un ciclo anual. Es decir, un año juliano a partir del inicio de la estación lluviosa (período de germinación de semillas). Este criterio de clasificación subestima aquellos casos en los cuales la población en su totalidad es eliminada a causa del manejo del terreno, pero cuya reposición de individuos ocurre en un período no mayor a doce meses.

**Cuadro 1.** Poblaciones activas de *Phaseolus lunatus* durante los ciclos de sucesión realizados a partir de noviembre de 1994. Se indica el número de poblaciones y el máximo estadio fenológico alcanzado durante cada ciclo anual.

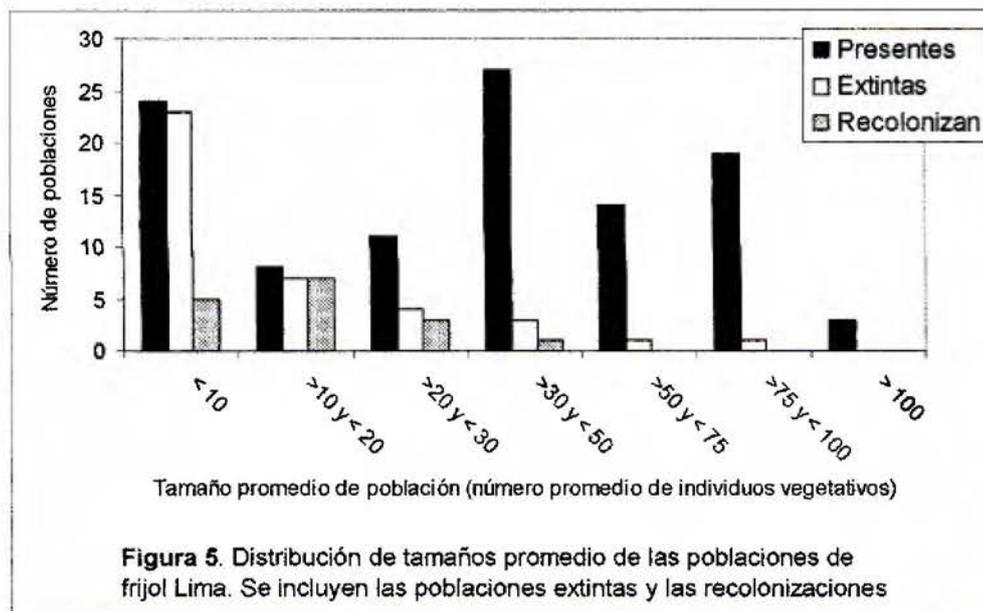
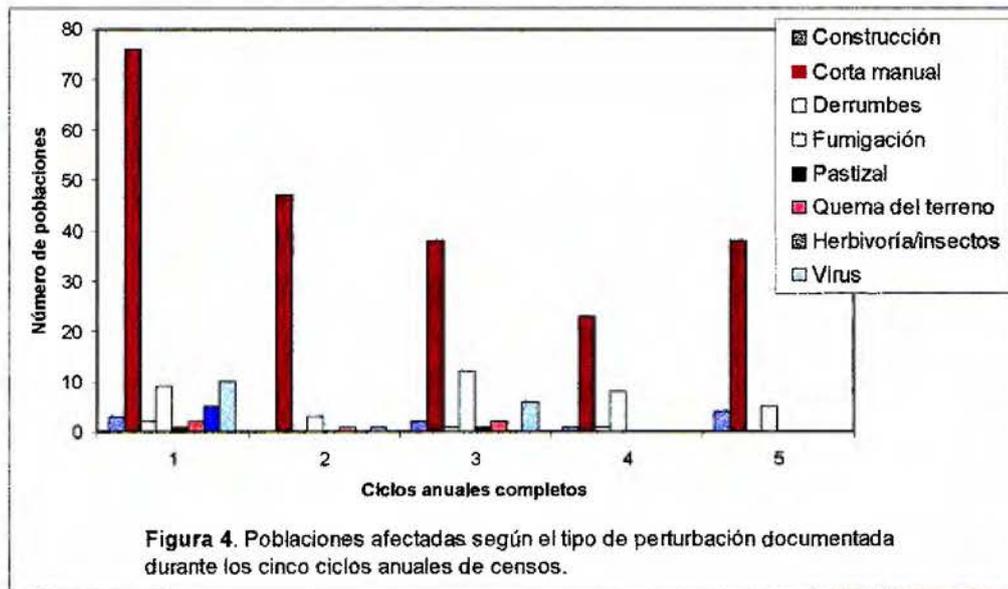
Ciclo anual	Poblaciones activas	Permanecen Vegetativas	Únicamente alcanzan floración	Maduración incompleta de frutos	Completan dispersión de semillas	Poblaciones extintas	Recolonizaciones
Mayo 94 a Abril 95	106	—	—	—	—	—	—
Mayo 95 a Abril 96	90	16	10	9	55	16	1
Mayo 96 a Abril 97	78	15	5	20	38	28	0
Mayo 97 a Abril 98	85	15	5	2	63	21	8
Mayo 98 a Abril 99	81	12	1	4	64	25	1
Mayo 99 a Abril 2000	86	10	2	13	61	20	6
Mayo 2000 a Dic 2000	77	16	8	3	50	29	0

Las poblaciones de frijol Lima del Valle Central fueron afectadas por una gran cantidad de perturbaciones. En la mayoría de las ocasiones las poblaciones se vieron alteradas por la intervención humana (Figura 3). La perturbación más frecuente fue la originada por la corta manual de malezas, ya sea en áreas con cultivos agrícolas, terrenos baldíos o zonas de desarrollo urbano. Durante el período de muestreo, 55% de las poblaciones fueron cortadas total o parcialmente, en al menos una ocasión. Sin embargo en la mayoría de los casos se dio el reemplazo de individuos dentro del mismo año gracias a la germinación de semillas provenientes del banco del suelo. Además de la limpieza manual de los terrenos, el uso de herbicidas resultó ser el segundo tipo de perturbación en orden de importancia (Figura 3). Esta forma de control de malezas causa efectos drásticos en la densidad de las poblaciones de frijol Lima ya que generalmente elimina a todos los individuos presentes en el momento de la aplicación. Por otro lado, un porcentaje bajo de las poblaciones fueron afectadas por procesos que redujeron tanto el número de individuos vegetativos como el tamaño del banco de semillas del suelo (construcciones, derrumbes del terreno, utilización de fuego o establecimiento de pastizales). Aquellas perturbaciones no causadas por la acción humana y que de algún modo perjudicaron la capacidad reproductiva de las poblaciones, representaron únicamente alrededor del 12% de los eventos registrados (ataque de virus o herbívoros).



Se registró para cada uno de los ciclos anuales observados, el número de poblaciones que fueron afectadas por cada tipo de perturbación. Los datos indican que, independientemente del año, la principal causa de perturbación fue la corta manual de malezas (Figura 4). Por otro lado, la importancia relativa de las otras causas de perturbación fue variable y no afectó del mismo modo a todas las poblaciones durante los distintos períodos muestreados. Cabe señalar

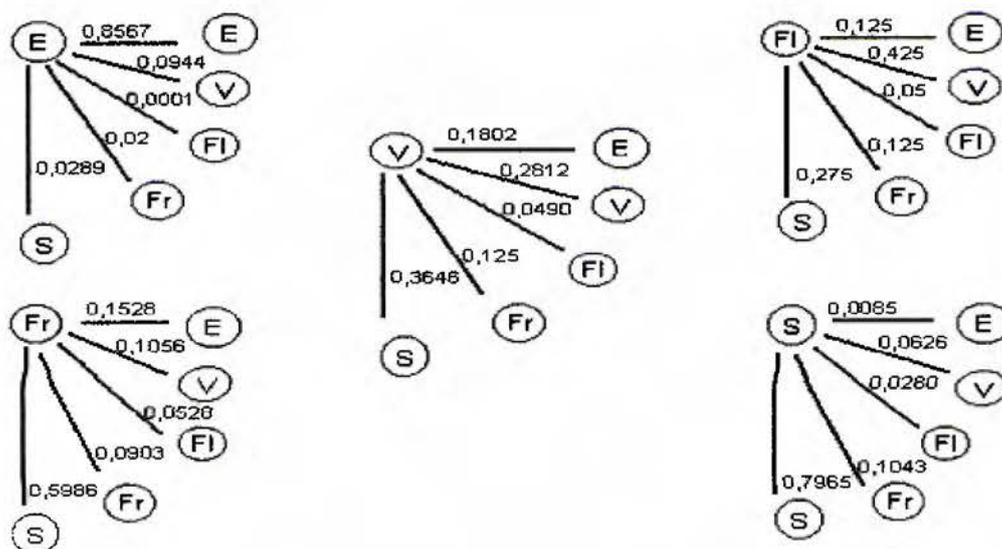
que, en todos los casos el número de poblaciones que experimentaron perturbaciones es superior al número de poblaciones extintas (Figura 4, Cuadro 1). Esto indica que muchas de las poblaciones lograron producir semillas a pesar de haber sufrido perturbaciones.



Las poblaciones con una mayor probabilidad de sufrir una extinción permanente fueron aquellas que durante el período de muestreo presentaron un tamaño promedio menor a 20 individuos ( $p=0,93$ , Figura 5). Al aumentar el tamaño promedio de la población se observó una disminución en el riesgo de extinción permanente ( $p=0,36$ , para poblaciones con tamaños entre 20 y 30 individuos y  $p<0,075$ , para poblaciones con tamaño promedio mayor a los 50

individuos). Asimismo, las poblaciones de tamaño promedio superior a los diez individuos, mostraron una mayor tasa de recolonización (Figura 5). La información obtenida en este estudio mostró que un número considerable de poblaciones (41%) mantuvo un tamaño promedio menor a 30 individuos. Este cálculo se basó en el número total de individuos vegetativos presentes en cada uno de los ciclos anuales registrados.

Al calcular las probabilidades de transición para cada uno de los cinco estadios fenológicos estudiados, se observó que las poblaciones que experimentan una extinción local poseen una alta probabilidad de permanecer en dicho estadio ( $p=0,8567$ , Figura 6). Aquellas poblaciones que producen semillas alcanzan con mayor facilidad la misma condición en el período reproductivo siguiente ( $p=0,7965$ ) y son las que presentan menor probabilidad de extinción. Las poblaciones que producen frutos pero no maduran semillas también muestran una alta probabilidad de producir semillas en el siguiente ciclo anual. Las poblaciones que solamente llegan a producir flores presentan una mayor probabilidad de pasar a ser poblaciones vegetativas y esta probabilidad es aún mayor que la de que las propias poblaciones vegetativas continúen en este estadio. En las poblaciones que permanecen vegetativas, el estadio más probable de alcanzar durante el siguiente ciclo es la producción de semillas, en segundo lugar continuar en estado vegetativo y en tercer lugar la extinción de la población.

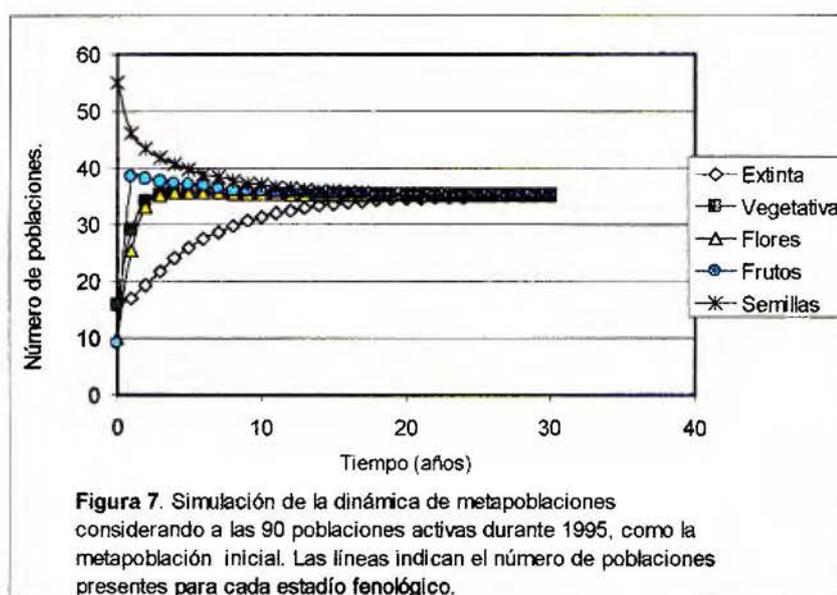


**Figura 6. Probabilidades de transición estimadas para los estadios fenológicos analizados (E=población extinta, V=población vegetativa, FI=flores, Fr=frutos, S=semillas).**

La variación en el número de poblaciones y su distribución según el máximo estadio fenológico alcanzado, se estudió con un modelo de Markov simulando su comportamiento para 50 ciclos anuales. Este modelo incorpora en una matriz de Leslie las probabilidades promedio calculadas para cada uno de los cinco estadios fenológicos presentados en la figura 6. El

cálculo de los parámetros poblacionales se realizó mediante el programa Unified Life Models (Legendre y Clobert 1995). Este programa estimó la tasa según la cual aumenta o disminuye el número de poblaciones de la metapoblación (Lambda M). A pesar de la frecuencia de perturbaciones y de las extinciones periódicas, el valor de Lambda M para la matriz promedio fue muy cercano a uno ( $\lambda=0,999996$ ). Los resultados obtenidos sugirieron un posible aumento en el número de poblaciones de frijol Lima del Valle Central, si las condiciones permanecen constantes.

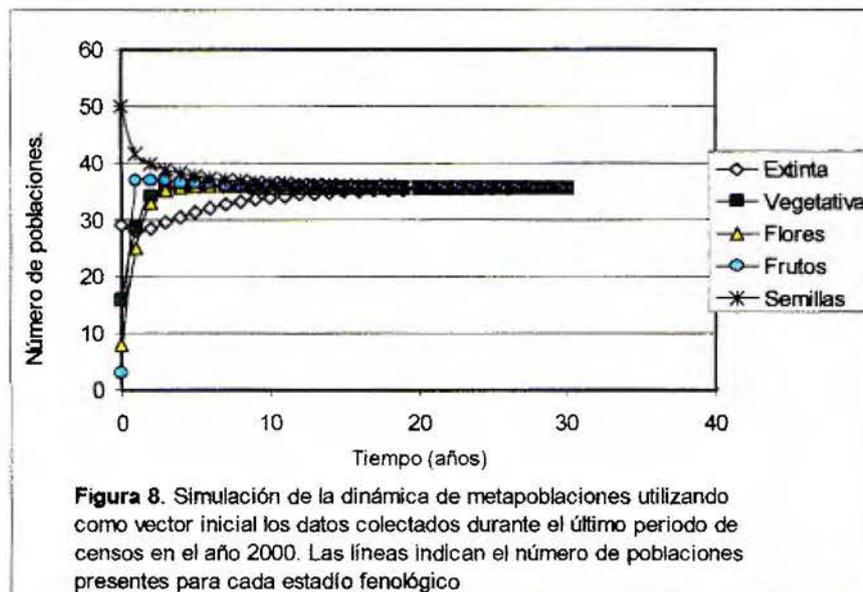
La trayectoria que siguieron las poblaciones a lo largo del tiempo, en cada uno de los estadios fenológicos analizados, varió según el escenario inicial. Se modelaron diversos escenarios utilizando como base la información recolectada durante los años de muestreo. Para ello se varió el vector inicial, es decir el número de poblaciones iniciales para cada estadio fenológico. En un primer escenario, se consideró como vector inicial las condiciones demográficas registradas durante 1995 (90 poblaciones activas con sus respectivos máximos estadios fenológicos alcanzados y 16 poblaciones extintas, Cuadro 1). Los resultados del modelo indican un aumento en el número de poblaciones que permanecen vegetativas o que solamente llegan a producir flores (Figura 7). Aquellas poblaciones que completan la dispersión de semillas disminuyen de forma acelerada hasta alcanzar un punto de equilibrio. Consecuentemente, el número de poblaciones extintas aumenta hasta alcanzar su máximo en la generación 15.



En un segundo escenario, el vector inicial incluyó las últimas condiciones registradas en las poblaciones del Valle Central, es decir, la información correspondiente al año 2000 (Cuadro 1, Figura 8). En este caso los resultados del modelo también sugieren un aumento en el número

de poblaciones y una dinámica de reemplazo entre poblaciones extintas y no extintas. En ambos casos, después de unas cuantas generaciones, la metapoblación mantuvo un número constante de poblaciones (aproximadamente 35 poblaciones en cada categoría). Además se ensayó un modelo en el cual el vector inicial incluía el número promedio de poblaciones observadas en cada uno de los distintos estadios fenológicos. La proyección de la metapoblación observada en este último caso fue muy similar a la mostrada en la Figura 7, con la única diferencia que en el equilibrio aumentó a 37 el número de poblaciones por categoría fenológica.

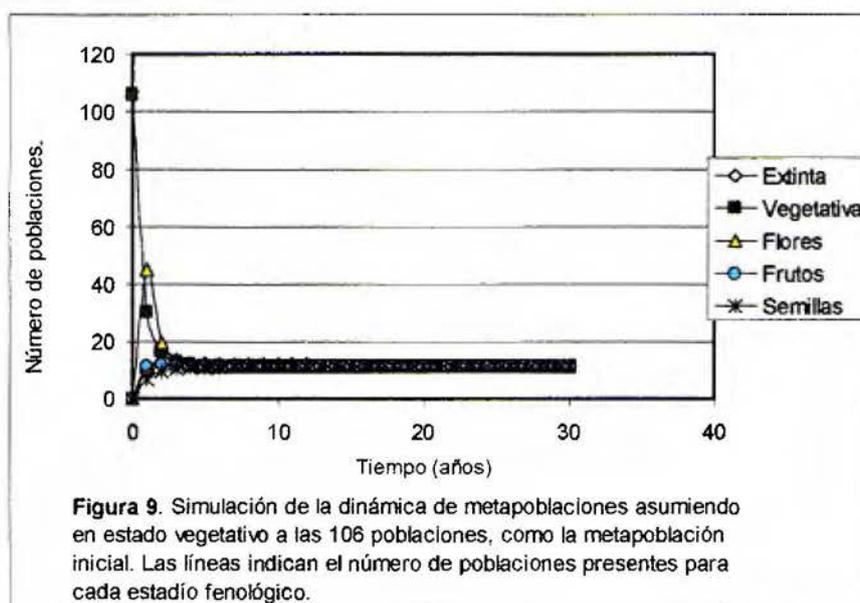
En un tercer escenario, se partió del supuesto que las 106 poblaciones censadas se encontraban en estado vegetativo al inicio del estudio ( $t_0$ ). Bajo dichas condiciones, se observó una disminución drástica en el número de poblaciones activas luego de pasado el tercer ciclo de la simulación (únicamente 11,4 poblaciones por categoría, Figura 9). No obstante, al igual que en los escenarios anteriores, la metapoblación alcanzó un estado de equilibrio; en el cual el número de poblaciones en todas las categorías permaneció muy similar (alrededor de 10 a 15 poblaciones en cada estadio). En cada uno de los escenarios modelados, la metapoblación siempre se dirigió hacia dicho equilibrio, sin importar las condiciones iniciales.



Con el propósito de determinar el efecto de la ausencia inicial de poblaciones en cada uno de los estadios considerados sobre el tamaño final de la metapoblación, se plantearon distintos escenarios en los cuales el número de poblaciones fue distribuido de forma igual pero en sólo cuatro de las cinco categorías fenológicas (Figura 10). En estas simulaciones se utilizaron las 106 poblaciones identificadas al inicio del estudio. Para efectos de comparación, se estableció como referencia un primer caso en donde las 106 poblaciones se distribuyeron de

forma equitativa entre las cinco categorías fenológicas (Figura 10-A). En dicha situación se mantuvo lo predicho por los escenarios anteriores. Es decir, al alcanzar valores similares en cada categoría, la metapoblación permanece en un equilibrio estable por varias generaciones.

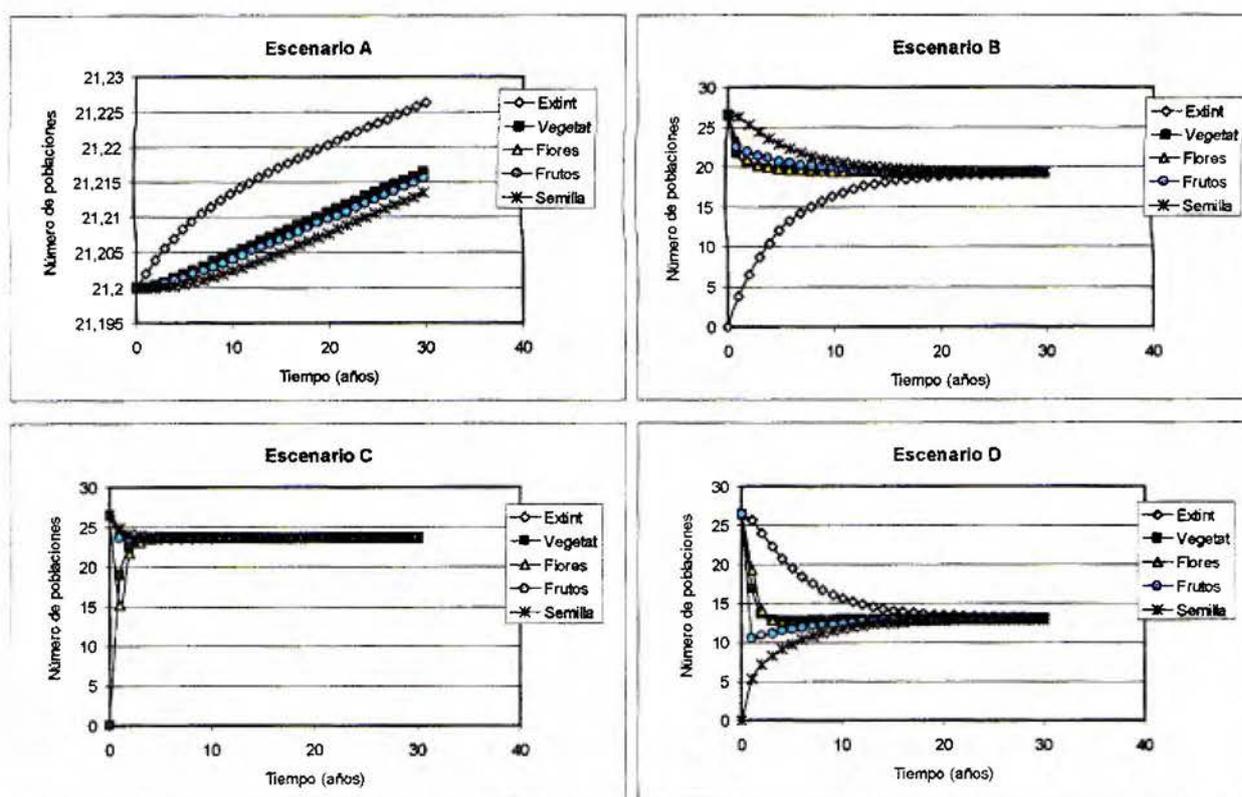
La ausencia de poblaciones en cualquiera de las categorías fenológicas trajo como consecuencia la reducción en el tamaño final de la metapoblación. Al reducir el número de poblaciones para cualquiera de los estadios, se dio una transición de poblaciones desde el resto de categorías hacia la categoría vacía, hasta alcanzar nuevamente el equilibrio. Los resultados más representativos se muestran en la Figura 10. En un primer caso se partió del supuesto que todas las poblaciones se encontraban activas, es decir, no habían poblaciones extintas. Las condiciones dadas por el modelo anticiparon la extinción de poblaciones como un proceso normal en la metapoblación de frijol Lima del Valle Central; aún cuando no se consideró la presencia de poblaciones extintas desde el inicio (Figura 10-B). La proyección dada por el modelo indicó la necesaria existencia de sitios ocupados por poblaciones actualmente extintas.



En un caso intermedio se consideró la ausencia de poblaciones en las categorías vegetativa, con flores o con frutos (Figura 10-C). En cada uno de los tres escenarios intermedios la dinámica de la metapoblación no presentó diferencias significativas. Bajo estas circunstancias iniciales, el estado de equilibrio se obtuvo en un número menor de generaciones y con una tasa de extinción menor que en los escenarios anteriores. La proyección de la metapoblación, por el contrario, sugiere un aumento en los eventos de colonización (aumenta el número de poblaciones activas), la recuperación de los sitios anteriormente ocupados o ambas. La información recopilada durante los cinco años de censos confirmó que los eventos de

recolonización en sitios donde se creía que la población había sido eliminada en su totalidad, son frecuentes (Cuadro 1).

Finalmente, la mayor caída en el número de poblaciones activas se dio al eliminar de la metapoblación original a aquellas en la categoría de semillas (Figura 10-D). El número total de poblaciones activas se redujo de 79,5 a 52 poblaciones al final de la simulación y en el equilibrio sólo hubo 13 poblaciones en cada categoría. A diferencia de lo observado en la Figura 9, en donde se dio también la ausencia de poblaciones que producen semillas, el aumento en su número resultó ser más lento. La llegada de poblaciones a este estadio parece ser de gran importancia para garantizar la estabilidad y permanencia de la metapoblación. En este caso, el potencial de la metapoblación para colonizar nichos disponibles se vio considerablemente reducido.



**Figura 10.** Escenarios hipotéticos que suponen: (A) igual número de poblaciones en todos los estadios fenológicos, (B) ausencia de poblaciones extintas en la metapoblación inicial, (C) ausencia de poblaciones en cualquier estadio fenológico intermedio y (D) la ausencia de poblaciones dispersoras de semillas en la metapoblación inicial.

Los resultados de estos modelos no sugieren que las poblaciones de frijol Lima del Valle Central presenten de un evidente riesgo de extinción. Esto a pesar de la frecuencia de las perturbaciones que afectan la reproducción y viabilidad de las poblaciones. Por el contrario, si las condiciones dadas para la región se mantienen sin cambio, se espera la colonización de

nuevos sitios y el surgimiento de nuevas poblaciones. También se espera que aumente el número de poblaciones que permanecerán extintas por cada ciclo anual.

## Discusión

Este estudio describe la dinámica de la metapoblación utilizando como modelo la totalidad de las poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) presentes en el Valle Central de Costa Rica. Los datos obtenidos han permitido identificar los principales factores que afectan la viabilidad y la demografía de la especie en la región central del país. El manejo que se le da a la tierra, principalmente la limpieza manual de malezas y el uso de herbicidas, son las principales causas de extinción de las poblaciones de frijol Lima. Las extinciones locales no permiten a las poblaciones concluir su ciclo reproductivo y renovar los reservorios de semillas depositados en el suelo. No obstante, al proyectar las probabilidades de transición a los distintos estadios fenológicos utilizando un modelo de matrices, se observó un amplio dinamismo en los procesos de extinción de las poblaciones existentes y la colonización de nuevas poblaciones previamente no consideradas. Asimismo, se documentó la recuperación de algunas poblaciones después de experimentar múltiples perturbaciones.

Se encontró una relación inversa entre el tamaño promedio de las poblaciones y la probabilidad de estas de sufrir extinciones locales. Además, la capacidad de las poblaciones de recuperarse luego de atravesar períodos de extinción local, parece ser superior en aquellas poblaciones que mantuvieron tamaños promedio mayores durante el período de censos. Algunos estudios han demostrado que el tiempo de permanencia de las poblaciones, dentro de un sistema de metapoblaciones, es mayor para aquellas poblaciones de tamaños grandes en comparación con poblaciones pequeñas (Hanski *et al.* 1996). Según esto, las poblaciones pequeñas o sometidas a perturbaciones continuas que afectan su reproducción o estabilidad, poseen mayores tasas de extinción en comparación con sus contrapartes de tamaño mayor (Hanski *et al.* 1996). La disminución en el tamaño de las poblaciones se ha correlacionado con la reducción en su tamaño efectivo y esta a su vez con el aumento en la probabilidad de extinción de la población, como consecuencia de la expresión de genes deletéreos recesivos o debido a la pérdida de las ventajas adaptativas que brindan ciertas variantes genéticas ante cambios en las condiciones ambientales (Gilpin 1991, Vrijenhoek 1994). Sin embargo, la persistencia de tamaños reducidos refleja también la frecuencia con que estas poblaciones se encuentran sometidas a perturbaciones que afectan su viabilidad y reproducción, así como la renovación de sus reservas de semillas en los bancos del suelo. En este caso, el grado de estocasticidad ambiental al cuál se encuentran sometidas las poblaciones, influye en el aumento en la probabilidad de extinción permanente de las mismas (Hanski *et al.* 1996).

La tasa de migración entre poblaciones (en este caso la dispersión de semillas) constituye también un factor importante al considerar la capacidad de recuperación de aquellas poblaciones extintas y la colonización de nuevos sitios (Hanski 1991, Hansson 1991, Cain *et al.* 2000). La llegada de semillas desde poblaciones vecinas incrementa el flujo genético entre estas y puede amortiguar el efecto de las perturbaciones que reducen la reproducción dentro de la misma población (Ebenhard 1991, Cain *et al.* 2000). El grado de significancia de este flujo de genes sobre poblaciones recientemente colonizadas, dependerá en gran parte, de las tasas relativas con que dichos genes se muevan hacia los hábitat vacíos (colonización) o entre las poblaciones ya establecidas (migración), (Thrall *et al.* 1997). Pero debido a su difícil documentación, existen pocos estudios sobre la efectividad de la dispersión de semillas a larga distancia en las poblaciones vegetales (Gillman 1997, Cain *et al.* 2000). Esta última tampoco a sido documentada en el frijol Lima en el Valle Central. Los posibles agentes dispersores (mamíferos, aves, viento, agua o insectos) no han sido identificados. El movimiento de los propágulos a distancias cortas o medias se debe principalmente a la apertura explosiva de las vainas, al perder estas su humedad durante la estación seca.

Los resultados obtenidos de los censos sugieren una disminución en el número de poblaciones presentes en el Valle Central, no así en su capacidad para colonizar nuevos nichos o de recuperar poblaciones localmente extintas. Estudios anteriores sugieren que los procesos de fusión y fisión en las poblaciones de *P.lunatus* del Valle Central ocurren con frecuencia (Rocha *et al.* 1997). Gracias a su asociación con sitios alterados y sistemas agrícolas tradicionales (en un momento parte dominante del paisaje del Valle Central) las poblaciones de frijol Lima posiblemente fueron más numerosas y de mayor tamaño con respecto al presente. A partir de los primeros censos (realizados en 1992) se observó un incremento en la tasa de extinción en las poblaciones, principalmente debido al acrecentamiento en la frecuencia e intensidad de los agentes causantes de perturbaciones que afectan la reproducción y viabilidad de la especie. Sobresalen entre estos el manejo intensivo de los cultivos y el aumento en la urbanización (Rocha *et al.* 1997). El riesgo de extinción en las poblaciones estudiadas de frijol Lima, no puede predecirse únicamente por el tamaño de estas. Si bien las poblaciones con menor número de individuos tuvieron mayor probabilidad de extinción, también se debe tomar en cuenta que el efecto del tamaño de la población no es independiente de la frecuencia con que su hábitat es alterado (Rocha *et al.* 1997, Rocha *et al.* 2002).

Algunos modelos consideran como variables tanto el mínimo número de poblaciones necesarias para permitir la permanencia de la metapoblación como la cantidad de nichos potenciales no ocupados. Varios de los modelos poblacionales asumen que la probabilidad de extinción y la de colonizar nuevos nichos es la misma para todas las poblaciones (Hastings 1991). Estudios recientes, sin embargo, reconocen la heterogeneidad de la matriz en la cual se

establece la metapoblación. La persistencia de una metapoblación dependerá tanto del desarrollo local de las poblaciones individuales, como también del panorama completo de cuántos nuevos fragmentos del hábitat son colonizados en cada período reproductivo y del número de poblaciones que se extinguen (Harding y McNamara 2002). La estocasticidad, definida como *fluctuaciones en las metapoblaciones que no son causadas por su dinámica intrínseca, sino por variaciones ambientales que se correlacionan con la tasa de extinción y recolonización*; puede determinar la estabilidad, persistencia o coexistencia a nivel de la metapoblación (Hanski 1991, Hastings 1991, Hanski *et al.* 1996). Las consecuencias demográficas de un incremento en la estocasticidad ambiental, incluyen la disminución en el tiempo de persistencia de la metapoblación, al aumentar la tasa de extinción de las poblaciones que la conforman. Este mismo efecto a nivel general ocurre cuando se incrementa la inestabilidad en el ámbito regional. Es decir, la capacidad de crecimiento de la metapoblación puede verse tanto o más afectada cuando se incrementa o disminuye de manera heterogénea la incidencia de perturbaciones ambientales a nivel local (Hanski 1991, Hasting 1991, Haski *et al.* 1996).

Al utilizar un modelo de matrices para proyectar el comportamiento de la metapoblación, se está considerando el paso de un estadio a otro como un evento que depende de una probabilidad dada por las condiciones a las cuales esta se encuentran sometida. Al respecto Caswell (1989) realiza una revisión completa sobre los modelos de matrices de Leslie y Lefkovitch en el estudio de los procesos demográficos. La consideración de los distintos escenarios para las poblaciones de frijol Lima en el Valle Central, permite predecir lo que sucedería en la metapoblación si se mantienen condiciones similares al promedio de estos cinco años de censos. El comportamiento observado refleja una dinámica metapoblacional compleja y resalta la importancia de las poblaciones que logran completar su ciclo reproductivo en mantener la estabilidad demográfica de la especie. Así como lo demostraron los distintos escenarios, si el número de poblaciones que colaboran con la dispersión de nuevos individuos es baja, la capacidad de recolonización de los sitios afectados por perturbaciones frecuentes disminuye. Es posible que esto sea una consecuencia del agotamiento del banco de semillas del suelo o la falta de disponibilidad de semillas que puedan ser dispersadas a nuevos sitios. Sin embargo, la colonización de nuevos sitios y el aumento en el número de poblaciones a partir de las 106 poblaciones iniciales, resultó inesperado. La existencia de bancos de semillas en sitios anteriormente ocupados por poblaciones ahora extintas, la capacidad de dispersión de semillas a largas distancias o ambas, deben ser tomadas en cuenta en el estudio de las poblaciones de frijol Lima en el Valle Central. La permanencia de poblaciones en estadios intermedios refleja la constante intervención de agentes generadores de perturbaciones. Se espera que las poblaciones más recientes, las de menor tamaño y las más aisladas, sean las

más propensas en ser afectadas por la pérdida o alteración del hábitat (Haski 1991, McCauley 1993, Stöcklin y Fischer 1999). No obstante, la ubicación de la población respecto a los centros urbanos y el manejo que en el futuro se dé a los hábitat en los que se encuentra la especie, determinará en última instancia su vulnerabilidad.

Una de las principales consecuencias de atravesar por períodos de crecimiento negativo es la reducción de la variabilidad genética y el aumento de la diferenciación genética entre poblaciones. Esto es producto de la reducción en el tamaño efectivo de las poblaciones (Maruyama y Kimura 1980, McCauley 1993). Estudios previos de la estructura genética de las poblaciones del Valle Central confirman estas predicciones (Maquet *et al.* 1996, Bi Irié 1999). Degreef (1998) propone que la principal fuente de reclutamiento de individuos durante períodos desfavorables proviene del banco de semillas del suelo. El mismo autor ha demostrado que las semillas pueden permanecer dormantes en el suelo hasta por tres años. No obstante los datos recolectados por el autor señalaron que la mayoría de semillas germinan en el primer año luego de ser dispersadas (70% a 84%). Sus datos también demuestran que luego de tres años habrán germinado cerca del 99% de las semillas depositadas en el banco del suelo (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998). En el ámbito poblacional, la presencia de un banco de semillas reduce la probabilidad de extinción en años malos y sirve de reservorio de genes para la población (Kalisz 1992, Kalisz y McPeck 1993, Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998, Nunney 2002, Morris *et al.* 2002). El banco semillas estabiliza la dinámica poblacional y ayuda a mantener un equilibrio cuando se dan oscilaciones en el tamaño de la población. Los resultados obtenidos por Degreef *et al.* (1997) indican que las poblaciones silvestres de *P.lunatus* en el Valle Central, se caracterizan por una alta fecundidad y por una alta mortalidad. Su estrategia constituye la de una especie oportunista con una gran capacidad de colonización de sitios poco favorables (Degreef *et al.* 1997). Pero al mismo tiempo es capaz de prolongar su permanencia en un sitio gracias a la deposición de semillas que le permiten la recolonización del mismo.

La estrategia de expansión que siguen las poblaciones de frijol Lima como metapoblación posee un componente substancial de migración a través del tiempo, por medio de la dormancia de sus semillas. El papel preponderante que desempeña la dispersión de semillas a larga distancia en las metapoblaciones de plantas pone en discusión un problema ya planteado, se conoce muy poco sobre la dinámica de la dispersión a larga distancia. Pero no sólo es importante la dispersión espacial, también debe considerarse la función que desempeña la dormancia en la migración temporal y su papel en hábitat degradados (Cain *et al.* 2000, Degreef *et al.* 2002). Algunos autores afirman que el banco de semillas cumple una función trascendental en la recuperación de la población cuando esta atraviesa por períodos de extinción. Además, es importante como reservorio de la variabilidad genética, en especial ante la incidencia de cuellos de botella (Kalisz y McPeck 1993, Stöcklin y Fischer 1999, Nunney

2002). Estas implicaciones teóricas del banco de semillas sobre la evolución y dinámica de las poblaciones, apoyan la necesidad de incorporar el efecto de la variación temporal en las poblaciones naturales, dentro del diseño y análisis de los estudios demográficos del mismo (Kalisz y McPeck 1993).

La importancia de los resultados obtenidos para la conservación *in situ* de la especie resulta obvia. Las principales causas de perturbación así como el estado demográfico y las condiciones reproductivas en las poblaciones de frijol Lima indican la urgencia de controlar los efectos que el manejo de los terrenos y las prácticas agrícolas ejercen sobre las poblaciones presentes en el Valle Central. El modelo presentado refuerza la importancia de la dispersión de semillas en mantener activas las poblaciones. Así también se sugieren la necesidad de nuevos estudios que consideren el efecto que sobre la variación genética interna de las poblaciones ejercen las fluctuaciones en el tamaño de la metapoblación y la importancia de la dispersión de semillas a largas distancias en la colonización de hábitat temporales. Sin embargo queda claramente demostrado que el manejo tradicional de los terrenos afecta el establecimiento y permanencia de las poblaciones de frijol Lima, principalmente cuando este se realiza de manera intensiva disminuyendo el tamaño de la población e impidiendo a los individuos alcanzar el estadio fenológico de dispersión de semillas.

## Bibliografía PARTE 1

Bi Irié, Zoro. 1999. **Variabilité génétique des populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. dans la vallée centrale du Costa Rica et ses implications dans la mise au point d'une stratégie de conservations *in situ*.** Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Bélgica. 194pp

Cain, M.L., Milligan, B.G. and Strand, A.E. 2000. **Long-seed dispersal in plant populations.** American Journal of Botany. 87(9):1217-1227.

Caswell, H.1989. **Matrix population models.** Sinauer Associates Inc. E.E.U.U. 328pp

Degreef, J. 1998. **Développement d'un modèle démographique et applications à la conservations *in situ* au populations sauvages de haricot de Lima (*Phaseolus lunatus* L.) dans la vallée centrale du Costa Rica.** Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Bélgica. 191pp

Degreef, J., Baudouin, J.P. and Rocha, O.J. 1997. **Case studies on breeding systems and consequences for germplasm conservation 2. Demography of wild Lima bean populations in Central Valley of Costa Rica.** Genetic Resources and Crop Evolution. 44:429-438.

Degreef, J., Rocha, O.J., Vanderborgh, T. and Baudouin, J.P. 2002. **Soil seed bank and seed dormancy in wild populations of Lima beans (Fabaceae): considerations for *in situ* and *ex situ* conservation.** American Journal of Botany 89(10):1644-1650.

Dirección General de Estadística y Censos. 1953. **Censo Agropecuario 1950.** Ministerio Economía y Hacienda. Costa Rica. 315pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1974. **Censos Nacionales de 1973, Agropecuario**. Ministerio de Hacienda, 2ª ed 1975. Costa Rica. 286pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1975. **Censo de Población de Costa Rica, 22 de mayo de 1950**. Ministerio de Hacienda, 2ª ed. Costa Rica. 42-99pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1987. **Censo Agropecuario 1984**. Ministerio de Hacienda, 2ª ed 1975. Costa Rica. 315pp

Ebenhard, T. 1991. **Colonization in metapopulations: a review of theory and observations**. Biological Journal of the Linnean Society. 42:105-121

Ellstrand, N.C. and Elam, D.R. 1993. **Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation**. Ann. Rev. Ecol. Syst. 24:217-242.

Gillman, M. 1997. **Plant population ecology**. En: Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V. and Hawkes, J.G. 1997. **Plant genetic conservation: the *in situ* approach**. Chapman and Hall. E.E.U.U. pp114-131.

Gilpin, M. 1991. **The genetic effective size of a metapopulation**. Biological Journal of the Linnean Society. 42:165-175.

Hanski, I. 1991. **Single-species metapopulation dynamics: concepts, models and observations**. Biological Journal of the Linnean Society. 42:17-38.

Hanski, I., Molane, A. and Gyllemer, M. 1996. **Minimum variable metapopulation size**. The American Naturalist. 147(4):527-541.

Hansson, L. 1991. **Dispersal and connectivity in metapopulations**. Biological Journal of the Linnean Society. 42:89-103.

Harding, K.C. and McNamara, J.M. 2002. **A unifying framework for metapopulation dynamic**. The American Naturalist. 160(2): 173-185.

Hastings, A. 1991. **Structure models of metapopulation dynamics**. Biological Journal of the Linnean Society. 42:57-71.

Hastings, A. and Harrison, S. 1994. **Metapopulation dynamics and genetics**. Ann. Rev. Ecol. Syst. 25:167-188.

Hess, G.R. 1996a. **Linking extinction to connectivity and habitat destruction in metapopulation models**. The American Naturalist. 148(1):226-236

Hess, G. 1996b. **Disease in metapopulation models: implication for conservation**. Ecology. 77(5):1617-1632.

Husband, B.C. and Barrett, S.C.H. 1996. **A metapopulation perspective in plant population biology**. Journal of Ecology. 84:461-469.

INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) 2001. **IX Censo Nacional de Población y Vivienda, Resultados Generales, Costa Rica agosto 2001**. INEC. 80pp

Kalisz, S. 1992. **Demographic of an age-structured annual: Resample projection matrices, elasticity analyses, and seed bank effects**. Ecology. 73(3): 1082-1093.

Kalisz, S. and McPeck, M. A. 1993. **Extinction dynamics, populations grow and seed banks: an example using an age-structured annual**. Oecologia. 95:314-320.

Legendre, S. and Clobert, J. 1995. **ULM, a software for conservation and evolutionary biology**. Journal of Applied Statistics. 22, 817-834.

- Loveless, M.D. and Hamrick, J.L. 1984. **Ecological determinants of genetic structure in plant populations.** *Ann Rev. Ecol. Syst.* 15:65-95.
- Maquet, A., Vekemans, X. and Baudoin, J.P. 1999. **Phylogenetics study on wild allies of Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin.** *Plant systematics and evolution.* 218: 43-54.
- Maquet, A., Zoro Bi, I., Rocha, O.J., and Baudoin, J.P. 1996. **Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation 1. Isoenzyme diversity in wild Lima bean populations in central Costa Rica.** *Genetic Resources and Crop Evolution.* 43: 309-318.
- Maruyama, T. and Kimura, M. 1980. **Genetic variability and effective population size when local extinction and recolonization of subpopulation are frequent.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77(11):6710-6714.
- McCauley, D.E. 1993. **Evolution in metapopulations with frequent local extinction and recolonization.** En: Futuyma, D. and Antonovics J. 1993. *Oxford Surveys in Evolutionary Biological.* Edit Oxford Univ. Press. pp109-134.
- Morris, A.B., Baucom, R.S. and Cruzan, M.B. 2002. **Stratified analysis of the soil seed bank in the cedar glade endemic *Astragalus bibullatus*: evidence for historical changes in genetic structure.** *American Journal of Botany.* 89(1): 29-36.
- Nunney, L. 2002. **The effective size of annual plant population: The interaction of a seed bank with fluctuating population size in maintaining genetic variation.** *The American Naturalist.* 160(2): 195-204.
- Quintana-Ascencio, P.F. and Menges, E.S. 1996. **Inferring metapopulation dynamics from patch-level incidence of Florida scrub plants.** *Conservation Biology.* 10(4):1210-1219.
- Rocha, O.J., Degreef, J., Barrantes, D., Castro, E., Macaya, G. and Guarino, L. 2002. **Metapopulation dynamic of Lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica.** En: M.M. Engels, J., Ramanatha Rao, V., H.D. Brown, A. and Jackson, M.T. 2002. *Managing plant genetic diversity.* CABI Publishing. (IPGRI) Italy. pp205-215.
- Rocha, J.O., Macaya, G. and Baudoin, J.P. 1997. **Causes of local extinction and recolonization determined by 3 year of monitoring wild populations of *Phaseolus lunatus* L. in the Central Valley of Costa Rica.** *Plant Genetics Resources Newsletter.* 112:44-48
- Stöcklin, J. and Fischer, M. 1999. **Plants with longer-lived seeds gave lower local extinction rates in grassland remnants 1950-1985.** *Oecologia.* 120: 539-543.
- Thrall, P.H., Richards, C.M., McCauley, D.E. and Antonovics, J. 1997. **Metapopulation Collapse: The consequences of limited gene-flow in spatially structures populations.** En: Bascompte, J. and Solé, R.V. 1997. *Modeling Spatiotemporal Dynamics in Ecology.* Edit Landes Bioscience. pp79-100
- Vrijenhoek, R.C. 1994. **Genetic diversity and fitness in small populations.** En: Loescheke, V., Tomiuk, J. and Jain, S.K. 1994. *Conservation Genetics.* Birkhauser Verlag Basel. Switzerland. pp37-53.

## Efecto de las extinciones locales sobre la estructura genética de poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Central de Costa Rica

Barrantes A, Daniel<sup>1</sup>, Rocha, O.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio" San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

### Resumen

En Costa Rica está presente el frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) en numerosas poblaciones silvestres, distribuidas en distintas regiones del país. En el Valle Central del país, estas poblaciones se encuentran ubicadas principalmente a orillas de caminos, plantaciones tradicionales de café y, ocasionalmente, en zonas urbanas. Debido a su potencial como fuente de recursos fitogenéticos, desde 1994 se le ha dado seguimiento mensual a 106 poblaciones silvestres del Valle Central. En cada censo, se registró el número de individuos presentes, su estado de desarrollo y su estadio fenológico, lo que permitió identificar la ocurrencia de extinciones locales como consecuencia del manejo de la tierra y las prácticas agrícolas. Se documentó también la recolonización de sitios donde anteriormente estaba presente la especie. Este estudio evaluó el efecto provocado por los ciclos de extinción y recolonización sobre la estructura genética de las poblaciones. Se demostró que el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones presentes antes y después de un evento de extinción, depende de la frecuencia de renovación del banco de semillas del suelo en años anteriores. Se discute la importancia de estos resultados en el desarrollo de estrategias para la conservación *in situ* de este recurso fitogenético.

**Palabras clave:** *Phaseolus lunatus*, frijol Lima, metapoblaciones, extinciones locales, diversidad genética, microsatélites.

### Introducción

Muchas especies vegetales se constituyen en metapoblaciones al ocupar ambientes heterogéneos o hábitat fragmentados a causa de las actividades humanas. Además, estas poblaciones experimentan procesos de extinción y recolonización como parte importante de su dinámica (Husband y Barrett 1996, Álvarez-Buylla *et al.* 1996). La estructura genética de las

poblaciones que integran una metapoblación estará determinada, en gran medida, por las características reproductivas de la especie y los procesos ecológicos que la afecten (Loveless y Hamrick 1984, Hansson 1991). La diversidad genética intrapoblacional estará directamente afectada por el tamaño efectivo de la población a lo largo del tiempo, el flujo genético entre poblaciones (migración de semillas o intercambio de polen) y las fuerzas de selección natural en cada uno de los sitios (Loveless y Hamrick 1984, Hamrick y Godt 1989, Hansson 1991, Heywood 1991, Gilpin 1991, Ellstrand y Elam 1993, Álvarez-Buylla *et al.* 1996). Estudios realizados con marcadores moleculares han brindado contribuciones importantes al conocimiento de la influencia que tienen estos factores en el mantenimiento de la variación genética (Cain *et al.* 2000, Cruzan 2001). No obstante, la relación entre la estocasticidad demográfica y genética con la probabilidad de extinción de las poblaciones, aún no es bien comprendida (Newman y Pilson 1997).

Bajo una perspectiva de conservación, los procesos de extinción y recolonización en las metapoblaciones acarrearán la disminución del tamaño efectivo de las poblaciones afectadas (Gilpin 1991, Wang y Caballero 1999). Esto puede darse como consecuencia de la reducción en el número de individuos o como producto de la colonización de nuevos nichos por pequeños grupos de emigrantes (Thrall *et al.* 1997). La fragmentación y destrucción del hábitat y el estrés ambiental causado por las actividades humanas, también puede limitar o reducir el tamaño poblacional (Ellstrand y Elam 1993). Aún cuando no están claras todas las posibles causas, varios autores coinciden en afirmar que la probabilidad de extinción en las poblaciones se incrementa a medida que estas ven disminuido su tamaño (Álvarez-Buylla *et al.* 1996, Hanski *et al.* 1996, Harding y McNamara 2002). Asimismo, aquellas poblaciones en sitios recientemente colonizados corren un mayor riesgo de extinción con respecto a aquellas ya establecidas (Ebenhard 1991), principalmente como consecuencia de su mayor sensibilidad a cambios estocásticos en el ambiente (Harding y McNamara 2002).

La disminución de la variabilidad genética dentro de las poblaciones se ve afectada por la reducción en el número de individuos presentes y por la intensidad del flujo genético entre poblaciones. Numerosos autores han señalado que el incremento en los procesos de deriva genética y el aumento en la endogamia, son típicos de poblaciones pequeñas (Ellstrand y Elam 1993, McCauley 1993, Álvarez-Buylla *et al.* 1996, Thrall *et al.* 1997). Bajo estas condiciones, cuando el flujo genético es reducido, la diferenciación genética entre poblaciones aumenta (Ellstrand y Elam 1993, McCauley 1993, Álvarez-Buylla *et al.* 1996). Una de las consecuencias más destacadas de la reducción en el tamaño de las poblaciones es el aumento en la homocigosis y la reducción de la viabilidad de la población. Esto puede ser particularmente importante para las especies predominantemente exógamas, en donde se aumenta la expresión de genes deletéreos recesivos, o se disminuyen las ventajas que en determinado ambiente

pueden representar los genotipos heterocigotas (Álvarez-Buylla *et al.* 1996, Newman y Pilson 1997, Thrall *et al.* 1997). En las especies donde el autocruzamiento es común, los efectos de la endogamia pueden ser menores (Álvarez-Buylla *et al.* 1996, Newman y Pilson 1997, Thrall *et al.* 1997).

Numerosas poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus*) se encuentran distribuidas de manera natural en el Valle Central de Costa Rica. Estas se asocian a regiones alteradas tales como terrenos agrícolas, pastizales y plantaciones tradicionales de café de sombra. En algunos casos se les encuentra presentes en zonas urbanas o en las orillas de caminos (Degreef *et al.* 1997, Rocha *et al.* 1997, Degreef 1998). Cambios en el manejo de los terrenos agrícolas y en el uso de la tierra, la utilización masiva de agroquímicos en las plantaciones, y el desarrollo urbano acelerado, han puesto en riesgo de extinción local a gran cantidad de poblaciones de frijol Lima. Estudios recientes demostraron que un considerable número de estas poblaciones ha experimentado la fragmentación de su hábitat, extinciones locales y se han reportado la recolonización de sitios previamente desocupados (Rocha *et al.* 1997). Se desconocen los posibles efectos que acarrearán estos procesos demográficos característicos de una metapoblación, sobre la estructura y diversidad genética de las poblaciones de frijol Lima. Este estudio describe, mediante poblaciones modelo, los cambios ocurridos en la variabilidad genética del frijol Lima del Valle Central, luego de que sus poblaciones atraviesan distintos períodos de perturbación, extinciones locales y recolonizaciones.

## Metodología

**Especie estudiada.** El frijol Lima silvestre tiene un hábito trepador y se le considera una especie perenne de vida corta. Típicamente presenta crecimiento indeterminado durante la estación lluviosa. Pero en la estación seca, y como respuesta al desbalance hídrico, pierde sus hojas y permanece latente gracias a su tallo lignificado. En este período se da la dispersión de semillas mediante la apertura explosiva de las vainas (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998, Bi Irié 1999). Una característica importante de las poblaciones de *P.lunatus*, es su habilidad para mantener reservas de sus semillas en el suelo. Estas pueden permanecer viables hasta tres años después de ser dispersadas (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998). La dormancia de las semillas es inducida durante la estación seca como respuesta al desbalance hídrico. Mientras que la germinación se da con el inicio de la estación lluviosa (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998, Degreef *et al.* 2002).

Sus flores son muy similares a las del frijol común (*P.vulgaris*), se presentan en pseudoracimos y requieren la visita de algún polinizador para transferir exitosamente el polen de las

anteras al estigma. La especie es autocompatible y la autofecundación es muy común, sin embargo, la tasa de exocruzamiento es importante y puede variar significativamente dentro y entre poblaciones (Maquet *et al.* 1999, Bi Irié 1999).

**Área de estudio.** La región central de Costa Rica (Valle Central) alberga las cuatro principales cabeceras de provincia y la mayoría de la población urbana del país. Tradicionalmente, ésta se ha caracterizado por ser una región agrícola cafetalera. Sin embargo, en los últimos cincuenta años ha experimentado un acelerado crecimiento demográfico (Dirección General de Estadística y Censos 1953, 1975, 1974, 1987, INEC 2001). Esto trajo como consecuencia un abandono de las prácticas agrícolas tradicionales y cambios radicales en el uso de la tierra. Gran cantidad de terrenos, anteriormente dedicados a actividades agropecuarias o de vocación forestal, se han convertido en áreas dedicadas al desarrollo urbano habitacional, afectando de manera directa o indirecta el establecimiento de muchas especies naturales.

Una numerosa cantidad de poblaciones silvestres de frijol Lima se encuentran dispersas en el Valle Central de Costa Rica. Estas se han definido como grupos de individuos separados entre sí por distancias no mayores a los 500 metros (Maquet *et al.* 1996, Rocha *et al.* 2002). Se les encuentra entre los 09°47' y 10°09' latitud Norte, y 83°50' y 84°30' de longitud Oeste (Maquet *et al.* 1996, Rocha *et al.* 1997, Degreef 1998). Su distribución altitudinal oscila entre los 500 a 1800 m.s.n.m. Esta especie comúnmente se halla asociada a sitios alterados, orillas de caminos, terrenos baldíos y sistemas agroforestales tradicionales como los cafetales de sombra. El cambio de uso de la tierra en el Valle Central ha puesto en riesgo de extinción a la mayoría de poblaciones de *P.lunatus* allí presentes (Rocha *et al.* 1997).

**Extinciones y recolonizaciones en las poblaciones del Valle Central.** Con el objeto de determinar el estado en el que se encontraban las poblaciones de frijol Lima en el Valle Central, se realizaron conteos mensuales de individuos en 106 poblaciones activas presentes a partir de noviembre de 1994 y hasta diciembre del 2000. Para tal efecto se establecieron seis transectos de muestreo utilizando los caminos vecinales que recorren el Valle Central (Rocha *et al.* 1997). La información obtenida incluyó el paso de las plantas a distintos estadios fenológicos y permitió identificar ciclos de extinción local y de baja actividad reproductiva en algunas poblaciones. La actividad de las poblaciones fue separada y ordenada en forma de ciclos anuales basados en la actividad fenológica de cada una de las poblaciones evaluadas. Se estableció como punto de partida el mes de mayo de cada año debido a que la germinación de las semillas presentes en el banco del suelo y la brotación de follaje en las plantas en reposo, coincide con el inicio de la estación lluviosa en el Valle Central. Mientras que la apertura de vainas y dispersión de semillas se ocurre durante la estación seca, periodo en el cuál, las

plantas adultas pierden su follaje e inician su período de inactividad fenológica. Es decir, la actividad fenológica de las poblaciones concluye durante los meses de diciembre a abril.

Se consideraron como extinciones locales aquellos periodos en los cuales no se presentaron eventos de germinación de semillas o individuos en estado vegetativo durante al menos un ciclo anual, es decir, un año juliano a partir del inicio de la estación lluviosa (período de germinación de semillas). La información brindada por los censos indicó una disminución en el número de poblaciones activas en los ciclos anuales estudiados y la ausencia de actividad reproductiva en un importante número de estas (Cuadro 1) (Barrantes 2003). Durante la mayoría de los ciclos anuales estudiados se registraron eventos de recolonización de poblaciones previamente extinguidas. El 75% de las poblaciones que recolonizaron los sitios lo hicieron un ciclo anual posterior al período de inactividad. Las restantes cuatro poblaciones permanecieron inactivas dos y hasta tres ciclos anuales consecutivos. De las poblaciones que permanecieron activas durante todo el período de estudio, únicamente 28 alcanzaron a madurar sus frutos y dispersar semillas en todos los ciclos anuales. La alta mortalidad de individuos dentro de las poblaciones y los escasos eventos reproductivos sugieren un efecto de erosión sobre la variabilidad genética de la especie en las poblaciones del Valle Central.

**Cuadro 1.** Poblaciones activas de *Phaseolus lunatus* durante los ciclos anuales sucedidos a partir de noviembre de 1994. Resumen de eventos reproductivos, extinciones y recolonizaciones (Tomado de Barrantes 2003).

Ciclo anual	Poblaciones activas	Permanecen Vegetativas	No finalizan reproducción	Completan dispersión de semillas	Poblaciones permanecen extintas	Recolonizaciones
Mayo 94 a Abril 95	106	—	—	—	—	—
Mayo 95 a Abril 96	90	16	19	55	16	1
Mayo 96 a Abril 97	78	15	25	38	28	0
Mayo 97 a Abril 98	85	15	7	63	21	8
Mayo 98 a Abril 99	81	12	5	64	25	1
Mayo 99 a Abril 2000	86	10	15	61	20	6
Mayo 2000 a Dic 2000	77	16	11	50	28	0

**Poblaciones estudiadas.** Con el objetivo de determinar el efecto que ejercen los ciclos de extinción y recolonización de las poblaciones sobre la diversidad genética de la especie, se realizó un análisis utilizando microsatélites de ADN. Se estudiaron poblaciones en tres tratamientos demográficos a saber: poblaciones recolonizadas, poblaciones testigos y poblaciones manipuladas. Las poblaciones seleccionadas para realizar los análisis de la diversidad genética según cada tratamiento se encontraron distribuidas por todo el Valle Central; su ubicación geográfica se indica en el Cuadro 2 y el área de estudio en la Figura 1. Para cada población, se realizó una comparación de la variación genética presente en individuos recolectados en dos diferentes momentos en el tiempo. En cada caso se trataron de

tomar muestras al azar de al menos 25 individuos por población y para cada fecha de recolección. En total, aproximadamente 50 individuos fueron recolectados en cada población.

Para el primer grupo de estudio llamado poblaciones recolonizadas, se seleccionaron cuatro poblaciones que sufrieron al menos un período de extinción y recolonización. Otro criterio utilizado para seleccionar dichas poblaciones fue la disponibilidad de semillas recolectadas en años anteriores a su extinción. En este grupo se encuentran las poblaciones Her2, E17, E29 y E38. La población E17 fue recolonizada dos ciclos anuales después de su extinción y el resto permanecieron inactivas solamente un ciclo anual. Este material fue comparado con muestras vegetativas provenientes de individuos presentes después de recolonización de los sitios.

Un segundo grupo fue conformado por poblaciones que permanecieron siempre activas desde noviembre de 1994 y para las cuales se tiene información de eventos reproductivos exitosos durante cada año. En este grupo, llamado testigo, se comparó la diversidad genética de la población a partir de semillas recolectadas en 1995, con una muestra de los individuos presentes en el año 2001. Dentro de este grupo, la población J58 fue la más alejada geográficamente del resto de las poblaciones estudiadas. Se incluyó además a la población E25 (población manipulada) debido a la disponibilidad de semillas recolectadas en 1995. Esto con el propósito de establecer la relación entre los patrones observados en este grupo y aquellas poblaciones sometidas a eventos de alta mortalidad pero en períodos breves de tiempo (poblaciones manipuladas).

El último grupo (poblaciones manipuladas) consistió en inducir un período de máxima mortalidad en cinco poblaciones con condiciones reproductivas similares a los testigos, mediante la corta de todos los individuos presentes. Los individuos de estas poblaciones fueron recolectados y cortados en su totalidad durante el último ciclo anual (mayo del 2000 a abril del 2001), antes de alcanzar los estadios de maduración de frutos y dispersión de semillas. En cada población se seleccionaron al azar 25 individuos para el análisis de la variación genética presente antes de la perturbación. Dos de las poblaciones manipuladas (E104 y E25) fueron expuestas una perturbación parcial dejando que un pequeño parche de individuos aislados completara su periodo de reproducción y dispersión de semillas. En la siguiente estación lluviosa todas las poblaciones se recuperaron de manera natural y se analizó la diversidad genética a partir de un tamaño similar de muestra, tomada de manera aleatoria de los individuos que recolonizaron el sitio.

**Extracción de ADN.** El material recolectado en el campo se utilizó para estudiar la diversidad genética de las poblaciones consideradas en este estudio. Se realizó una extracción de ADN a partir de material vegetativo (hojas o tallos de los individuos recolectados directamente del campo, o de plántulas recién germinadas). Se utilizó para la extracción de ADN el protocolo

desarrollado por Lodhi *et al.* (1994), con algunas modificaciones basadas en el protocolo del CIAT para extracción de ADN de frijol común (González *et al.* 1995). El buffer estándar consistió en EDTA (20mM), Tris-HCl (100mM, pH 8), NaCl (1,4mM), CTAB (2%) y Bis-Mercaptoetanol (0,2%). Después de haber macerado el tejido en presencia del buffer fueron necesarios de uno a dos lavados con cloroformo-octanol 24:1. El ADN se precipitó de la solución mediante dos volúmenes de etanol 95° y medio volumen de NaCl 5M. Posteriormente este se purificó mediante un lavado final con etanol 75° y se resuspendió en TE 1X.

**Cuadro 2.** Poblaciones estudiadas para cada uno de los tratamientos. Se muestra la ubicación geográfica, altitud y transecto de muestreo al cual pertenece (Rocha *et al.* 1997).

Población	Transecto	Comunidad	Lat Norte	Long Oeste	Altitud m.s.n.m.
<b>Recolonizadas</b>					
E17	3	San Antonio de Escazú	09° 53' 376	84° 07' 708	1382
E29	3	Quebrada Honda de Villa Colón	09° 53' 194	84° 13' 446	988
E38	2	Salitrillos de Aserrí	09° 51' 063	84° 05' 435	1423
Her2	6	Barva de Heredia	10° 01' 754	84° 07' 568	1332
<b>Manipuladas</b>					
E104	2	Jerico de Desamparados	09° 50' 140	84° 04' 436	1625
Km15	2	Vuela de Jorco de Aserrí	09° 48' 533	84° 06' 921	1638
Km51	5	Intersección Naranja, Palmares y Ciudad Quesada	10° 06' 492	84° 23' 797	1138
Km53	5	Naranja, en el Alto Murillo, Cerro Espiritu Santo	10° 05' 471	84° 24' 190	1250
E25*	3	San Antonio de El Llano de Alajuelita	09° 53' 293	84° 07' 302	1473
<b>Testigos</b>					
E25*	---	---	---	---	---
E88	4	Barreal de Heredia (Zona Franca)	09° 58' 875	84° 08' 560	1067
J11	3	San Antonio de El Llano de Alajuelita	09° 53' 486	84° 07' 040	1441
J58	5	San Ramón, camino a Piedades, en Sede Occidente (U.C.R.)	10° 05' 244	84° 28' 769	1088

\* Para esta población se colectaron muestras como testigo y como manipulada

**Análisis genético.** Para el análisis genético, se utilizaron microsatélites de ADN. Se usaron tres loci cuyos iniciadores fueron diseñados para el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) por Yu *et al.* (2000). Las secuencias, temperatura y tiempos de desnaturalización, hibridación y extensión para los marcadores utilizados se presentan en el Cuadro 3. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador de calentamiento por aire "Rapid Cycler" (Idaho Technology). Los productos de las amplificaciones se separaron en un gel de secuenciación de acrilamida-urea al 5% de 39cm, con un campo eléctrico de 55watt (8000 Volt) y a una temperatura de 55°C. Una vez separadas las bandas amplificadas de ADN, estas fueron visualizadas usando el protocolo de tinción de plata para acrilamida (PROMEGA).

Los datos recolectados se analizaron en el programa PopGen32 versión 1.31 desarrollado por Yeh, Yang y Boyle (1999). Como medidas de la variación genética se calculó la heterocigosis promedio y el número efectivo de alelos en cada muestra. El índice de diferenciación entre poblaciones ( $F_{ST}$ ) dado por Nei (1978) se utilizó como parámetro para

determinar el cambio a través del tiempo en la estructura genética de las distintas poblaciones analizadas. La capacidad de las poblaciones actuales de recuperar la variación genética existente en años pasados se calculó mediante el número efectivo de migrantes ( $N_m$ ) el cuál es una medida basada en el cálculo de la  $F_{ST}$ .

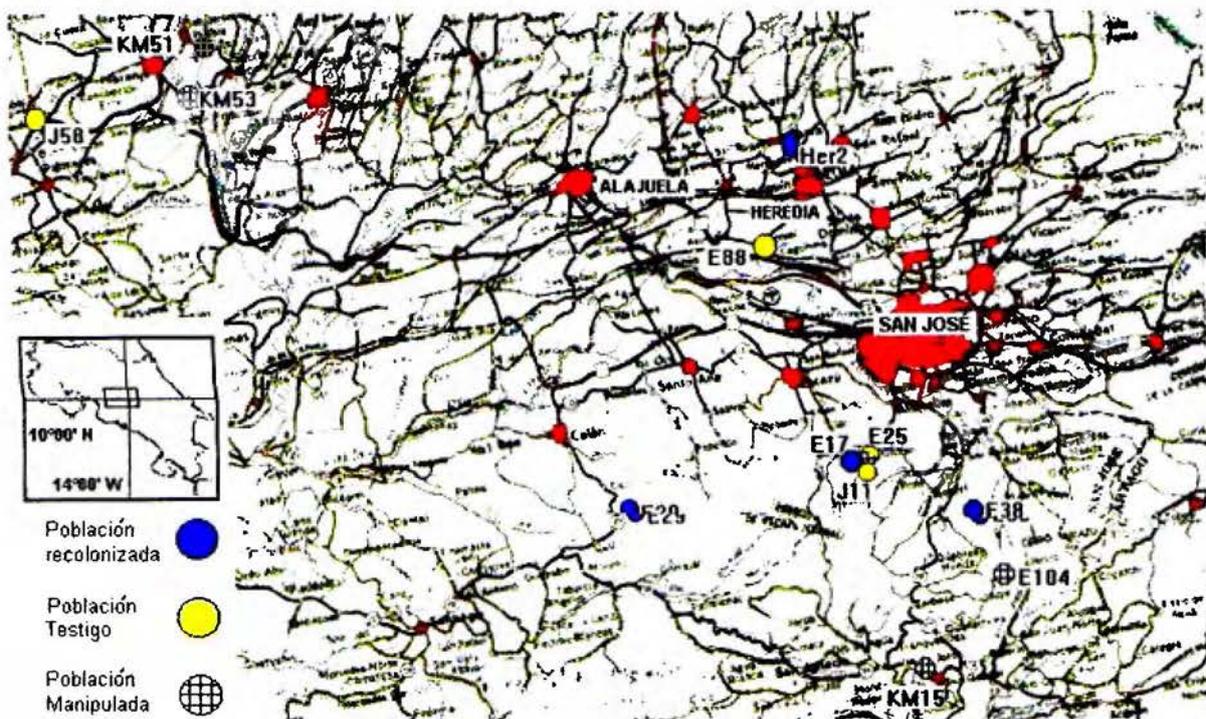


Figura 1. Área de estudio. Se indica la ubicación de las poblaciones estudiadas y el grupo al cual pertenece cada una de ellas.

Se realizó una prueba de contingencias ( $\chi^2$ ) con el objeto de determinar el grado de significancia en la variación de las frecuencias alélicas para cada una de las comparaciones realizadas (James *et al.* 1998). Esta prueba de heterogeneidad está basada en el modelo de apareamiento para multiloci mixtos ("multilocus mixed mating model"). En este caso se adaptó la fórmula en la cual  $D=NG_{ST}(a-1)$ , se sustituyó la  $G_{ST}$  por los valores obtenidos de  $F_{ST}$ . El número "N" de gametos (polen + óvulos) correspondió al total de alelos presentes en la población comparada a través del tiempo, y "a" el número de alelos distintos presentes en ambas muestras. Los grados de libertad estuvieron dados por  $gl=(a-1)$ .

## Resultados

Los censos realizados en las 106 poblaciones durante el período de 1994 al 2000 indicaron la ocurrencia de eventos de extinción y recolonización. Los datos evidenciaron que 39 poblaciones atravesaron por períodos de extinción local, definiéndose éstas como períodos de

no brotadura o presencia de individuos adultos por uno o más ciclos anuales. Únicamente 16 poblaciones de aquéllas que sufrieron extinción local (el 41.03%) recolonizaron los sitios en años posteriores. Cabe destacar que el criterio de clasificación de poblaciones extintas no incluye aquellos casos en los cuales la población en su totalidad es eliminada a causa del manejo del terreno, pero que se reestablece la presencia de individuos en un período no mayor a 12 meses.

**Cuadro 3.** Iniciadores de microsatélites (SSR) utilizados en las poblaciones de *P. lunatus*.

Nombre del SSR	Motivo	Tamaño (pb)	Secuencia (forward / reverse)	Alelos en <i>P. vulgaris</i>	Gen Bank Número de accesión.	Programa utilizado para PCR
PV-ctt001	(CTT)3(T)3 (CTT)6	152	gagggtgttcactattgtcactgc ttcatggatggtggaggaacag	5	J04555	5min a 95°C; 30X (10s a 94°C, 25s a 57°C, 40s a 72°C); 4min a 72°C
PV-at004	(AT)18	163	aatctgccgagagtggtcctgcc gattgaaatarcaaagagaattgttac	5	X61293	5min a 95°C; 30X (10s a 94°C, 25s a 57°C, 40s a 72°C); 4min a 72°C
PV-at006	(AT)5	132	ccgttgccgtatttcccat cgtgtgaagtcactcggagtggtc	4	X74919	5min a 95°C; 30X (10s a 94°C, 25s a 48°C, 40s a 72°C); 4min a 72°C

Los datos obtenidos también indicaron la ausencia de producción de semillas en muchas poblaciones que permanecieron activas en cada ciclo anual. De las poblaciones que permanecieron activas durante todo el período de muestreos, solamente 28 (el 41,79%) completaron su ciclo reproductivo durante todos los años. Sin embargo muchas de éstas, incluidas aquéllas que produjeron semillas durante el período de muestreo, sufrieron de perturbaciones antropogénicas que disminuyeron su tamaño (Barrantes 2003). Además, se encontró que, en promedio, un 17% de las poblaciones que permanecieron activas cada año no alcanzaron a iniciar su reproducción, pues no produjeron botones florales. Esto indica que no contribuyeron al flujo génico entre poblaciones.

**Análisis genético.** El análisis de la diversidad genética indica que sólo dos de los tres loci considerados fueron polimórficos en todas las poblaciones. En total se encontró para el locus PV-ctt001 cinco alelos, dos alelos para el locus PV-at004 y tres alelos para el locus PV-at006. No obstante, dos de los tres alelos identificados para el locus PV-at006 (B y C) se presentaron únicamente en las muestras correspondientes a las poblaciones E104 año 2001 y E25 año 1995, respectivamente. En la mayoría de los casos, los mismos alelos se presentaron en la mayoría de las poblaciones. Este fue el caso para los loci PV-at004 y PV-at006 en donde los alelos nombrados como "A" se presentaron en frecuencias altas en todas las poblaciones, no así en el locus PV-ctt001 en donde los alelos más abundantes fueron diferentes en algunos grupos de poblaciones. Destacaron para el locus PV-ctt001 los alelos nombrados como "A", "B" y "C" como aquellos que presentaron las frecuencias más altas dentro de las poblaciones

analizadas. Los resultados también mostraron variaciones en la presencia de alelos y sus frecuencias para las muestras tomadas de una misma población a través del tiempo. Estos cambios fueron observados más frecuentemente para los alelos menos abundantes.

Se determinaron los cambios en el grado de diferenciación genética entre las poblaciones de frijol Lima durante los cinco años de seguimiento. Para ello se calculó el índice de diferenciación de Nei ( $F_{ST}$ ) para las muestras recolectadas durante el período 1994 a 1995 y se comparó con el obtenido para las mismas poblaciones recolectadas durante el período 2000 a 2001. Se utilizaron las poblaciones testigo E25, J11, E88 y J58, y las poblaciones recolonizadas Her2, E38 y E29. Los valores obtenidos fueron:  $F_{ST}=0,3419$  para el período 1994 a 1995 y  $F_{ST}=0,4202$  para el período 2000 a 2001. Este análisis, señala un aumento de la diferenciación genética entre las poblaciones de frijol Lima, para los dos periodos analizados.

**Poblaciones recolonizadas.** Los resultados indicaron cambios en la frecuencia y en algunos casos en el número de alelos amplificados para los loci polimórficos en este grupo de poblaciones y a lo largo del tiempo (Cuadro 4). En dos de las cuatro poblaciones estudiadas se encontraron nuevas variantes genéticas en las muestras posteriores a la recolonización de los sitios y que no estaban presentes en las muestras anteriores al periodo de extinción local. Este fue el caso del alelo "B" en el locus PV-ctt001 para las poblaciones E17 y E38 respectivamente. Asimismo, se observó la pérdida o fijación de alelos a lo largo del tiempo para las muestras provenientes de las poblaciones E17 y E29, para este mismo locus (Cuadro 4).

El fenómeno más comúnmente observado fue la disminución, a lo largo del tiempo, en las frecuencias de los alelos menos abundantes en todas las poblaciones pertenecientes a este grupo (Cuadro 4). Esta variación temporal se presentó para todos los loci que resultaron polimórficos para este grupo de poblaciones, con excepción del alelo "C" en locus PV-ctt001 para la población Her2, el cuál incrementó su abundancia de 37% en 1995 a 97% en el 2001. Así mismo, en la población E17 se observó la sustitución del único alelo presente en el locus PV-ctt001 para la muestra tomada en 1997, con respecto la muestra del año 2001. En ambos casos, el alelo más abundante en la población presente antes del periodo de extinción, vio reducida su frecuencia en la población posterior a la recolonización del sitio. En general, los resultados indican un cambio importante en las frecuencias alélicas a través del tiempo, principalmente en el locus PV-ctt001, el cual también resultó ser el más diverso en el número de alelos encontrados, al considerarse todos los grupos de poblaciones analizados. El diseño del experimento no permitió determinar con certeza la procedencia de las nuevas variantes genéticas reportadas para las muestras tomadas posterior a la recolonización de los sitios. Es decir, no fue posible determinar si estas variantes provenían de un banco de semillas

depositado por la población misma en años anteriores o de semillas dispersadas desde poblaciones cercanas.

El número efectivo de alelos disminuyó en tres de las poblaciones que sufrieron extinción y recolonización. En la población Her2 se presentó la mayor reducción en el número efectivo de alelos ( $n_e = 1,42$  y  $n_e = 1,12$ , respectivamente), en segundo lugar este indicador disminuyó en la población E29 de  $n_e = 1,34$  a  $n_e = 1,167$ , mientras que, en la población E38 esta medida de variación genética tendió a incrementarse en la muestra tomada posterior a la recolonización de la población (Cuadro 5). En la población E17, también se observó una disminución en el número efectivo de alelos a lo largo del tiempo, pero en menor magnitud con respecto a las otras poblaciones de este grupo (Cuadro 5).

**Cuadro 4.** Frecuencias alélicas y número de individuos amplificados para cada locus (n) en las poblaciones recolonizadas. Se resaltan los loci que presentaron desequilibrio de Hardy-Weinberg (\*\*= $P < 0,05$ ).

Población Recolonizada	Alelos	Loci			Población Recolonizada	Alelos	Loci		
		PV-ctt001	PV-at004	PV-at006			PV-ctt001	PV-at004	PV-at006
Her2-1995	A		0,82609	1,00000	Her2-2001	A		0,85111	1,00000
	B	0,63043	0,17391			B	0,02778	0,13889	
	C	0,36957				C	0,97222		
	n	23**	23**	23		n	18	18	18
E17-1997	A	1,00000	0,77688	1,00000	E17-2001	A		0,88636	1,00000
	B		0,22414			B	1,00000	0,11364	
	n	28	29**	28		n	22	22	22
E38-1994	A	1,00000	0,79167	1,00000	E38-2000	A	0,57143	0,92500	1,00000
	B		0,20833			B	0,42857	0,07500	
	n	25	24	25		n	21	20	16
E29-1994	A		0,59524	1,00000	E29-2000	A		0,78571	1,00000
	B	0,95238	0,40476			B	1,00000	0,21429	
	C	0,04762				C			
	n	21	21	21		n	22	21	22

Las poblaciones Her2 y E17 presentaron un mayor desequilibrio según el modelo de Hardy-Weinberg, en las frecuencias genotípicas para los loci PV-ctt001 y PV-at004 en las muestras tomadas antes del período de extinción, con respecto a las muestras tomadas luego de la recolonización de los sitios (Cuadro 4). Las poblaciones E29 y E38 no presentaron desequilibrio de Hardy-Weinberg en las frecuencias genotípicas en las muestras tomadas antes y después del período de extinción. Sin embargo, en estas dos poblaciones se observó una deficiencia de heterocigotos con respecto a la heterocigosis calculada a partir de las frecuencias alélicas obtenidas, en las muestras E29-2000 y E38-1994 respectivamente (Cuadro 5). En la mayoría de las muestras tomadas, la heterocigosis observada fue menor a la esperada según las frecuencias alélicas obtenidas y el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg. Como consecuencia se presentaron índices de fijación mayores a cero en todas las poblaciones

(Cuadro 5). Sin embargo, en las muestras de las poblaciones Her2, E38 y E29 para los años 2001, 2000 y 1994 respectivamente, se presentaron índices de fijación negativos.

Los índices de fijación en las poblaciones recolonizadas presentaron una tendencia clara a reducirse a lo largo del tiempo. En las poblaciones Her2, E17, y E38 se observó una disminución en los índices de fijación en las muestras tomadas antes del periodo de extinción local con respecto a los observados en las muestras posteriores a la recolonización de las poblaciones (Cuadro 5). Por el contrario, en la población E29 se presentó un aumento en la deficiencia de heterocigotos a lo largo del tiempo. Estos resultados sugieren la presencia de endogamia en las poblaciones que presentaron una reducción de los índices de fijación, antes que estas atravesaran por el período de extinción local; y un aumento en el intercambio genético en las poblaciones que recolonizaron los sitios posterior su recolonización (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Descriptores de la variación genética (promedio y error estándar) para las poblaciones que presentaron ciclos de extinción y recolonización. Los valores presentados corresponden a:  $n_e$  = número efectivo de alelos, Obs\_Het =heterocigosis observada, Exp\_Het =heterocigosis esperada según el cálculo de las frecuencias alélicas y  $f$  =índice de fijación o endogamia obtenido mediante la fórmula:  $(H_e - H_o)/H_e$ .

Población Recolonizada		$n_e$	Obs_Het	Exp_Het	$f$
Her2-1995	Promed	1,4252	0,0435	0,2567	0,8021
	St. Error	0,2521	0,0251	0,1387	0,1047
Her2-2001	Promed	1,1238	0,1111	0,1005	-0,0950
	St. Error	0,0967	0,0849	0,0745	0,0664
E17-1997	Promed	1,1778	0,0575	0,1180	0,5043
	St. Error	0,1778	0,0574	0,1180	---
E17-2001	Promed	1,0841	0,0455	0,0687	0,3231
	St. Error	0,0841	0,0454	0,0687	---
E38-1994	Promed	1,1641	0,0833	0,1123	0,2421
	St. Error	0,1641	0,0833	0,1123	---
E38-2000	Promed	1,3737	0,2405	0,2147	-0,1239
	St. Error	0,2968	0,1711	0,1493	0,0428
E29-1994	Promed	1,3432	0,2063	0,1955	-0,0686
	St. Error	0,2948	0,1611	0,1514	0,0186
E29-2000	Promed	1,1692	0,0794	0,1150	0,2929
	St. Error	0,1692	0,0794	0,1150	---

Asimismo disminuyeron los valores calculados, según el modelo de Hardy-Weinberg, para la heterocigosis esperada en las poblaciones que recolonizaron los sitios después de atravesar por el periodo de extinción local. La población E38 fue la excepción para dicho patrón. No obstante, el número real de heterocigotos (heterocigosis observada), no presentó ninguna tendencia clara en disminuir o incrementar su magnitud a lo largo del tiempo para las poblaciones recolonizadas (Cuadro 5). En las poblaciones E29 y E17 este valor disminuyó a lo largo del tiempo, mientras que en las otras dos poblaciones el mismo indicador de diversidad tendió a aumentar.

El análisis de la estructura genética utilizando los índices F de Wright, indicó que una parte importante de la variación genética es debida a cambios que ocurren en el tiempo (Cuadro 6). En la población E17 ( $F_{ST}=0,6371$ ) más del 60% de la variación observada para la diversidad genética se presentó al comparar las muestras tomadas antes y después de la extinción local. En la población Her2 ( $F_{ST}=0,2620$ ), al menos una cuarta parte de la variación genética observada se debió a las diferencias presentes entre las muestras tomadas en distintos periodos de tiempo. Para la población E38 ( $F_{ST}=0,1678$ ) este porcentaje fue menor (aproximadamente el 15% de la variación presente es debida a diferencias en las dos muestras recolectadas), mientras que en la población E29 se presentaron pocos cambios en su estructura genética a través del tiempo ( $F_{ST}=0,0407$ ). Los valores obtenidos para los índices de  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  fueron superiores a cero en las poblaciones recolonizadas, con excepción de la población E38 (Cuadro 6). Todas las poblaciones recolonizadas mostraron una menor capacidad de recuperar la variación genética presente en las muestras originales con respecto al resto de grupos de poblaciones analizados.

**Cuadro 6.** Estimación de la diferenciación genética intra-poblacional para las poblaciones recolonizadas. Estadísticas F y flujo genético ( $N_e m$ ) calculado a partir del índice de diferenciación de Nei (1978).

Poblaciones Recolonizadas	Tamaño Muestra	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$N_e m$
Her2(95-2001)	82	0,5617	0,6765	0,2620	0,7044
E17(97-2001)	101	0,4378	0,7960	0,6371	0,1424
E38(94-2000)	87	-0,0056	0,1631	0,1678	1,2403
E29(94-2000)	85	0,0576	0,0960	0,0407	5,8916

El número efectivo de migrantes ( $N_e m$ ) en las cuatro poblaciones recolonizadas, presentó en general valores menores a los obtenidos para los otros grupos de poblaciones estudiados (poblaciones testigo y poblaciones manipuladas). En tres de las cuatro poblaciones recolonizadas, este indicador se mantuvo por debajo del promedio para este grupo ( $N_e m$  promedio =1,99), y de los valores obtenidos para los otros grupos de poblaciones (Cuadro 6, 10 y 14). En las poblaciones recolonizadas, la migración de variantes genéticas y su permanencia en frecuencias similares a lo largo del tiempo fue menor a la presentada por los otros grupos de poblaciones. Esto sugiere que, a pesar de ser muestras tomadas en el mismo sitio, no necesariamente son el reflejo de la población original.

Los resultados de análisis de contingencias para el cambio en las frecuencias alélicas, indicaron una variación significativa en las muestras tomadas antes del período de extinción y posterior a la recolonización. En tres de las cuatro poblaciones de este grupo se observaron cambios significativos a lo largo del tiempo, en las variantes amplificadas para el locus PV-

ctt001 (Cuadro 7). Este último presentó un mayor número de alelos en las poblaciones recolonizadas y también para el resto de grupos de poblaciones. Los valores obtenidos, confirmaron que los eventos de extinción y recolonización representan un factor importante al considerar la diferenciación y el cambio temporal de la variabilidad genética interna de las poblaciones de frijol Lima del Valle Central.

En resumen, tres de las cuatro poblaciones que presentaron eventos de extinción y recolonización disminuyeron el número de alelos efectivos presentes en las muestras anteriores al periodo de extinción local. En algunos casos se dio un cambio importante en las variantes alélicas observadas, pero más frecuentemente se observó una disminución de los alelos menos abundantes para los loci polimórficos. La heterocigosis observada no presentó un patrón claro de variación temporal en las poblaciones recolonizadas. No así el índice de fijación y la heterocigosis esperada los cuales tendieron a disminuir a lo largo del tiempo con pocas excepciones en cada caso. La diferenciación genética interna de las poblaciones presentó un patrón claro de variación temporal y alcanzó valores más altos que el resto de poblaciones no pertenecientes a este grupo de poblaciones. Se observó además, una reducida migración, a lo largo del tiempo, de la diversidad genética presente dentro de las poblaciones que atravesaron periodos de extinción y recolonización.

**Cuadro 7.** Valores de  $\chi^2$  para el análisis de contingencia correspondiente a los cambios en las frecuencias alélicas para cada locus, en las poblaciones recolonizadas. Se indica en cuales casos la variación fue significativa.

Poblaciones Recolonizadas	Loci		
	PV-ctt001	PV-at004	PV-at006
Her2(95-2001)	33,7184***	0,1886	---
E17(97-2001)	100***	2,2134	---
E38(94-2000)	25,0884***	3,2208	---
E29(94-2000)	2,0984	3,5616	---

\*\*\* $P < 0,001$ .

**Poblaciones testigo.** En el grupo de poblaciones testigo se comparó la variación genética presente dentro de las poblaciones que mantuvieron eventos reproductivos constantes a lo largo de los cinco años de censos. Las muestras tomadas durante 1995, fueron comparadas con otras tomadas durante el año 2000 para las mismas poblaciones, tratando de mantener una distancia temporal entre muestras similar a la conservada para las poblaciones recolonizadas.

La mayoría de estas poblaciones mantuvieron presentes los mismos alelos en ambas muestras, pero las frecuencias de estos presentaron algún grado de variación en el tiempo (Cuadro 8). En las poblaciones J11 J58 y E88, se incrementó la frecuencia de los alelos poco

abundantes para el locus PV-at004. Para el locus PV-ctt001 se observó disminución en la frecuencia de alelos poco abundantes lo largo del tiempo en las poblaciones J58, E25 y E88, asimismo en el locus PV-at006 para la población E25. En la población E25 se observó la pérdida por completo de alelos con frecuencias bajas y que estaban presentes en la muestra tomada durante el año 1995. Por el contrario, en la población J11 apareció en una frecuencia importante, un nuevo alelo no registrado en la muestra correspondiente al inicio del período de censos (Cuadro 8). Las poblaciones J11 E25 y E88 presentaron desequilibrio en las frecuencias genotípicas según el modelo de Hardy-Weinberg para el locus PV-ctt001, principalmente en las muestras correspondientes al año 2001 (Cuadro 8).

El número efectivo de alelos no presentó variación significativa en dos de las poblaciones testigo (poblaciones E88 y J58 respectivamente). Este indicador de la diversidad genética disminuyó en la población E25 a lo largo del tiempo y tendió a incrementarse en la población J11, acorde con los cambios observados en las frecuencias alélicas y en la aparición o pérdida de variantes genéticas (Cuadros 8 y 9).

**Cuadro 8.** Frecuencias alélicas y número de individuos amplificados para cada locus (n) en las poblaciones testigo. Se resaltan los loci que presentaron desequilibrio de Hardy-Weinberg (\*\*= $P < 0,05$ ).

Población Testigo	Alelos	Loci			Población Testigo	Alelos	Loci		
		PV-ctt001	PV-at004	PV-at006			PV-ctt001	PV-at004	PV-at006
J11-1995	A		0,88000	1,00000	J11-2001	A	0,16000	0,76000	1,00000
	B	1,00000	0,12000			B	0,84000	0,30000	
	n	25	25	25		n	25**	25	25
J58-1995	A	0,15385	0,76000	1,00000	J58-2001	A	0,04348	0,60870	1,00000
	B	0,84615	0,25000			B	0,95652	0,39130	
	n	25	25	25		n	23	23	23
E25-1995	A	0,84000	0,84000	0,98000	E25-2000	A	0,89588	0,90000	1,00000
	B	0,36000	0,16000			B	0,10417	0,10000	
	C			0,02000		C			
n	25**	25	25	n	24**	25	25		
E88-1995	A	0,04000	0,74000	1,00000	E88-2001	A	0,02000	0,58000	1,00000
	B	0,42000	0,26000			B	0,80000	0,42000	
	C	0,54000				C	0,18000		
n	25**	25	25	n	25**	25	25		

El índice de fijación indicó la deficiencia de heterocigotos en la mayoría de las muestras tomadas, con excepción de aquellas correspondientes a las poblaciones J11 y J58, ambas correspondientes al año 1995. En estas dos muestras, se presentó un excedente de heterocigotos con respecto a los esperados, según el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg (Cuadro 9). En general se observó una deficiencia de heterocigotos en la mayoría de las muestras tomadas para este grupo de poblaciones. En todas las poblaciones los niveles de endogamia aumentaron durante el periodo de observación, coincidiendo con una disminución a lo largo del tiempo en el número de heterocigotos observados con respecto a la heterocigosis

esperada según el modelo de Hardy-Weinberg, para ambas muestras en cada población. Los niveles observados de heterocigosis disminuyeron a lo largo del tiempo en las poblaciones J58 y E25. Asimismo, la heterocigosis calculada a partir de las frecuencias alélicas presentó una reducción a lo largo del tiempo en las poblaciones E88, J58 y E25, al comparar ambas muestras tomadas para cada población (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Descriptores de la variación genética (promedio y error estándar) para las poblaciones testigo. Los valores presentados corresponden a  $n_e$  = número efectivo de alelos, Obs\_Het = heterocigosis observada, Exp\_Het = heterocigosis esperada según el cálculo de las frecuencias alélicas y  $f$  = índice de fijación o endogamia obtenido mediante la fórmula:  $(H_e - H_o)/H_e$ .

Población Testigo		$n_e$	Obs_Het	Exp_Het	$f$
J11-1995	Promed	1,0892	0,0800	0,0718	-0,1364
	St. Error	0,0893	0,0800	0,0718	---
J11-2001	Promed	1,3639	0,1200	0,2343	0,5715
	St. Error	0,2091	0,1200	0,1253	0,4286
E88-1995	Promed	1,5850	0,2133	0,3113	0,2112
	St. Error	0,3267	0,1572	0,1614	0,5626
E88-2001	Promed	1,4788	0,2267	0,2770	0,2620
	St. Error	0,2743	0,1881	0,1463	0,4935
J58-1995	Promed	1,3173	0,2179	0,2159	-0,0525
	St. Error	0,1741	0,1095	0,1131	0,1294
J58-2001	Promed	1,3335	0,1449	0,1907	0,1122
	St. Error	0,2893	0,1045	0,1502	0,1577
E25-1995	Promed	1,4210	0,1200	0,2615	0,3044
	St. Error	0,2364	0,0611	0,1244	0,2636
E25-2000	Promed	1,1497	0,0539	0,1248	0,5550
	St. Error	0,0749	0,0352	0,0624	0,2217

La diferenciación genética en el tiempo ( $F_{ST}$ ) para las poblaciones testigo (Cuadro 10), fue menor a aquella mostrada por las poblaciones que experimentaron procesos de extinción y recolonización (poblaciones recolonizadas, Cuadro 6). En el grupo de poblaciones testigo, menos del 10% de la variación es debida al cambio en la estructura genética de las poblaciones a lo largo del tiempo (Cuadro 10). Solamente en la población E25 se presentó un valor de  $F_{ST}$  superior a 0,1, al compararse las muestras correspondientes a 1995 y 2001. En esta población se observó una pérdida de la variación existente a lo largo de los cinco años de estudio, (Cuadro 9). No obstante, en esta población la disminución en el número efectivo de alelos y en los niveles de heterocigosis se incrementó después de ser sometida a la eliminación de todos los individuos presentes, llevada a cabo en el 2001 como parte del experimento de manipulación realizado en esta y en otras poblaciones (Cuadros 9 y 13). En la población E25 los valores de  $F_{ST}$  se incrementaron en más del doble, durante un solo ciclo anual, al comparar las muestra tomadas antes y después de la perturbación y la muestra tomada en el año 1995

(Cuadro 10). Los valores de  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  se mantuvieron superiores a cero en todas las poblaciones testigo. El flujo de genes ( $N_e m$ ) en las poblaciones testigo superó los valores obtenidos para las poblaciones recolonizadas (Cuadros 10 y 6). Las poblaciones testigo presentaron en promedio una mayor migración efectiva con respecto a las poblaciones recolonizadas ( $N_e m$  promedio = 4,31). Los resultados mostraron que las poblaciones testigo mantienen tamaños efectivos, tasas de migración o ambos, entre dos y nueve veces mayores a los presentados por poblaciones que atraviesan por perturbaciones constantes.

**Cuadro 10.** Estimación de la diferenciación genética intra-poblacional para las poblaciones testigo. Estadísticas  $F$  y el flujo genético ( $N_e m$ ) calculado a partir del índice de diferenciación de Nei (1978).

Poblaciones Testigos	Tamaño Muestra	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$N_e m$
J11(95-2001)	100	0,3333	0,3737	0,0605	3,8793
E88(95-2001)	100	0,2368	0,3025	0,0860	2,6560
J58(95-2001)	98	0,0864	0,1104	0,0263	9,2605
E25(95-2000)	99	0,5418	0,5682	0,0578	4,0754
E25(95-2001)	98	0,4767	0,5449	0,1303	1,6680

El análisis de contingencia reveló cambios significativos en las frecuencias alélicas de la mayoría de las poblaciones testigo (Cuadro 11). Estas variaciones no siguieron ningún patrón en particular según lo observado en los Cuadros 8 y 9 para las frecuencias alélicas y el número efectivo de alelos respectivamente. Se presentó tanto la disminución como el aumento en el número efectivo de alelos y en los alelos menos abundantes para los loci PV-ctt001 y PV-at004. A pesar de estos cambios, en general las poblaciones testigo mantuvieron los mismos alelos dentro de cada población en un lapso de cinco años. La diferenciación genética y la pérdida de alelos efectivos no fue un fenómeno tan concluyente en las poblaciones de frijol Lima que completaron con éxito todos sus ciclos reproductivos, como si lo fue en las poblaciones recolonizadas.

**Cuadro 11.** Valores de  $\chi^2$  para el análisis de contingencia correspondiente a los cambios en las frecuencias alélicas para cada locus, en las poblaciones testigo. Se indica en cuales casos la variación fue significativa.

Poblaciones Testigos	Loci		
	PV-ctt001	PV-at004	PV-at006
J11(95-2001)	8,7**	4,88**	---
E88(95-2001)	27,58***	2,85	---
J58(95-2001)	3,3516	2,2442	---
E25(95-2000)	8,9964**	0,8	1,01
E25(95-2001)	15,4644***	8,526**	0,9898

\*\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

**Poblaciones manipuladas.** En este caso se provocó un período de máxima mortalidad o extinción local en un grupo de cinco poblaciones con características demográficas similares a las poblaciones testigo. El diseño del experimento consistió en eliminar todos los individuos presentes en la población antes que estos iniciaran un nuevo ciclo reproductivo. Se comparó el material recolectado antes de la manipulación, con el de los individuos que se establecieron en el transcurso del año siguiente. Eventos similares a éste son frecuentes en las poblaciones de frijol Lima del Valle Central de Costa Rica (Rocha *et al.* 1997, Barrantes 2003).

En estas poblaciones se presentaron cambios en la frecuencia de alelos presentes antes y después de la manipulación (Cuadro 12). En las poblaciones Km15 y E25 disminuyó la variación genética y algunas variantes poco abundantes en las recolectas iniciales no se encontraron en las muestras posteriores a la manipulación. Las población Km53 mantuvo los mismos alelos en ambas muestras, en la población E104 se dio tanto la pérdida como la aparición de nuevas variantes, y en la población Km51 se incrementó la diversidad genética al aumentar la frecuencia del alelo menos abundante para el locus PC-ctt001.

**Cuadro 12.** Frecuencias alélicas y número de individuos amplificados para cada locus (n) en las poblaciones manipuladas. Se resaltan los loci que presentaron desequilibrio de Hardy-Weinberg (\*\*= $P < 0,05$ ).

Población Manipulada	Alelos	Loci			Población Manipulada	Alelos	Loci		
		PV-ctt001	PV-at004	PV-at006			PV-ctt001	PV-at004	PV-at006
Km51-2000	A		0,86000	1,00000	Km51-2001	A		0,86364	1,00000
	B	0,38000	0,14000			B	0,50000	0,13636	
	C	0,62000				C	0,50000		
	n	25**	25	25		n	22**	22	22
Km15-2000	A		0,95833	1,00000	Km15-2001	A		1,00000	1,00000
	B		0,04167			B			
	C	1,00000				C	1,00000		
	n	24	24	24		n	18	21	20
Km53-2000	A	0,02083	0,92000	1,00000	Km53-2001	A	0,04348	0,98000	1,00000
	B	0,89583	0,08000			B	0,89130	0,02000	
	C	0,06250				C	0,04348		
	D	0,02083				D	0,02174		
n	24**	25	25	n	23	25	23		
E104-2000	A	1,00000	0,97826	1,00000	E104-2001	A	0,94118	1,00000	0,94444
	B		0,02174			B			0,05556
	C					C			
	D					D			
	E					E	0,05882		
n	22	23	22	n	17**	18	18**		
E25-2000	A	0,89583	0,90000	1,00000	E25-2001	A	0,95833	1,00000	1,00000
	B	0,10417	0,10000			B	0,04167		
	C					C			
	n	24**	25	25		n	24	24	24

Las poblaciones E104 y E25 fueron cortadas de forma parcial permitiendo la reproducción de una pequeña porción de las mismas. En estas dos poblaciones se observaron cambios mayores en el número de alelos presentes y la frecuencia de los mismos respectivamente, en comparación con aquellas poblaciones que fueron cortadas en su totalidad (Cuadro 12). A pesar de ello en una de estas poblaciones (E25) disminuyó la variación genética, mientras que en la otra (E104) se presentó un incremento en las frecuencias de nuevos alelos. Las variaciones observadas en las frecuencias alélicas de las poblaciones manipuladas indican que estas no siguieron ningún patrón en particular.

El número efectivo de alelos reportado en las poblaciones manipuladas mantuvo valores muy similares para las muestras tomadas antes de la perturbación con respecto a las poblaciones reestablecidas después de la perturbación (Cuadro 13). En algunos casos se presentó una tendencia a la disminución mientras que en otras poblaciones este índice de diversidad presentó una tendencia a incrementarse a lo largo del tiempo. Sin embargo, la variación observada para el número efectivo de alelos en este grupo de poblaciones, antes y después de la manipulación, fue menor a la que presentaron poblaciones de los otros grupos analizados (poblaciones recolonizadas y poblaciones testigo).

**Cuadro 13.** Descriptores de la variación genética (se indica el promedio y error estándar) para las poblaciones manipuladas. Los valores presentados corresponden a:  $n_e$  = número efectivo de alelos, Obs\_Het = heterocigosis observada, Exp\_Het = heterocigosis esperada según el cálculo de las frecuencias alélicas y  $f$  = índice de fijación o endogamia por deficiencia de heterocigotos calculado según:  $(H_e - H_o)/H_e$ .

Población Manipulada		$n_e$	Obs_Het	Exp_Het	$f$
Km51-2000	Promed	1,4028	0,1067	0,2422	0,3762
	St. Error	0,2608	0,0874	0,1388	0,5390
Km51-2001	Promed	1,4360	0,0606	0,2509	0,6141
	St. Error	0,2957	0,0606	0,1478	0,3860
Km15-2000	Promed	1,0289	0,0278	0,0272	-0,0435
	St. Error	0,0289	0,0278	0,0272	--
Km15-2001	Promed	1	0	0	--
	St. Error	0	0	0	--
Km53-2000	Promed	1,1371	0,0811	0,1157	0,2403
	St. Error	0,0712	0,0462	0,0594	0,3273
Km53-2001	Promed	1,0976	0,0713	0,0819	0,0579
	St. Error	0,0781	0,0526	0,0630	0,0783
E104-2000	Promed	1,0148	0,0145	0,0145	-0,0222
	St. Error	0,0148	0,0145	0,0145	---
E104-2001	Promed	1,0806	0	0,0740	1
	St. Error	0,0404	0	0,0371	0
E25-2000	Promed	1,1497	0,0539	0,1248	0,5550
	St. Error	0,0749	0,0352	0,0624	0,2217
E25-2001	Promed	1,0289	0,0278	0,0272	-0,0435
	St. Error	0,0289	0,0278	0,0272	--

En general se observó una deficiencia en el número de heterocigotos reportados para cada una de las muestras tomadas en el grupo de poblaciones manipuladas. Esto se evidenció en la obtención de índices de fijación superiores a cero en la mayoría de poblaciones. (Cuadro 13). Únicamente se presentaron valores de fijación negativos en las muestras tomadas para las poblaciones Km15, E104 y E25 correspondientes al año 2000 y 2001 para la población E25. Esta deficiencia de heterocigotos aumentó en las poblaciones Km51, Km15 y E104 luego de realizada la manipulación.

La heterocigosis observada para las poblaciones manipuladas disminuyó en todos los casos al comparar las muestras tomadas antes y después de la perturbación (Cuadro 13). Asimismo, en las muestras tomadas posteriores a la recuperación de las poblaciones cortadas, la heterocigosis esperada con base en el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg, disminuyó en tres de las cinco poblaciones de este grupo (Cuadro 13). Solamente la población E104 presentó un claro aumento en la heterocigosis esperada con base en el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que la población Km51 mantuvo valores similares en las muestras tomadas antes y después de la perturbación. Como consecuencia, el índice de fijación y la fijación de alelos se incrementó posterior a la manipulación en tres de las poblaciones manipuladas (Km51, E104 y Km15 respectivamente) mientras que solamente vieron disminuido su valor aquellas poblaciones que aumentaron el número efectivo de alelos en las muestras posteriores a la manipulación (Cuadro 13). Las muestras correspondientes al año anterior a la manipulación en este grupo de poblaciones presentaron en general valores de heterocigosis menores a los correspondientes para el mismo periodo de muestreo en el grupo de poblaciones testigo (Cuadros 9 y 13).

La diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) en las dos muestras tomadas para cada población manipulada fue pequeña, en comparación con los otros grupos de poblaciones analizados (Cuadro 14). Las poblaciones E25, E104 y Km15 registraron los valores de  $F_{ST}$  más altos dentro del grupo de poblaciones manipuladas. Sin embargo, con excepción de la población E104, las poblaciones manipuladas presentaron índices de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) inferiores a los observados para las poblaciones testigo. En las poblaciones E104 y E25, en las cuales no se cortaron todos los individuos, los sitios fueron recolonizados con el aporte del banco de semillas depositado en años anteriores y además la contribución por parte de la reproducción de los individuos de una pequeña fracción de la población que no fue cortada. Las poblaciones Km53 y Km51 mantuvieron una estructura genética similar a la presente originalmente en las muestras tomadas antes de la manipulación. Estas dos poblaciones fueron también las que presentaron un mayor número de variantes alélicas (Cuadro 12). Los valores obtenidos para  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  fueron superiores a cero con excepción de la población Km15 (Cuadro 14). En el grupo de poblaciones manipuladas los cambios presentados en la estructura genética posteriores a la perturbación de

las poblaciones correspondieron a menos del 4% de la variación presentada en las muestras tomadas antes y después de la manipulación.

El flujo genético ( $N_e m$ ) en el grupo de poblaciones manipuladas fue mayor al observado en los otros grupos de poblaciones ( $N_e m$  promedio =17,98), pero el mismo se mostró muy variable dentro de las mismas poblaciones que conforman este grupo (Cuadro 14). Las poblaciones cortadas parcialmente (E25 y E104) reportaron los valores más bajos con respecto al resto de poblaciones manipuladas, pero estos fueron en general mayores a los observados en los grupos de poblaciones (poblaciones testigo y recolonizadas). Como consecuencia, no se dieron cambios estadísticamente significativos en las frecuencias génicas de las poblaciones manipuladas (Cuadro 15). Solamente la población E25 mostró variación significativa en el locus PV-at004. En el resto de poblaciones manipuladas, los cambios en la diversidad genética presente no fueron lo suficientemente grandes para ser considerados estadísticamente significativos.

**Cuadro 14.** Estimación de la diferenciación genética intra-poblacional para las poblaciones manipuladas. Estadísticas F y el flujo genético ( $N_e m$ ) calculado a partir del índice de diferenciación de Nei (1978).

<b>Poblaciones Manipuladas</b>	<b>Tamaño Muestra</b>	<b>F<sub>IS</sub></b>	<b>F<sub>IT</sub></b>	<b>F<sub>ST</sub></b>	<b>N<sub>em</sub></b>
<b>Km51(2000-2001)</b>	94	0,6528	0,6562	0,0099	25,1295
<b>Km15(2000-2001)</b>	87	-0,0435	-0,0213	0,0213	11,5000
<b>Km53(2000-2001)</b>	97	0,2122	0,2176	0,0069	35,8376
<b>E104(2000-2001)</b>	81	0,7944	0,7997	0,0258	9,4467
<b>E25(2000-2001)</b>	97	0,4504	0,4671	0,0304	7,9785

En resumen, el grupo de poblaciones manipuladas presentó una mayor migración de variación genética preexistente a la perturbación, con respecto a lo observado para los otros grupos de poblaciones (poblaciones testigo y recolonizadas). Se registró una reducción en el número de heterocigotos y un incremento en la fijación de alelos en la mayoría de las poblaciones manipuladas, posteriores a la perturbación. Pero el número efectivo de alelos y como consecuencia la diversidad genética interna de las poblaciones, no mostró cambios significativos a corto plazo. Asimismo, se presentó poca diferenciación en estructura genética interna de las poblaciones manipuladas, a pesar de la perturbación provocada.

## **Discusión**

En este estudio se evalúan los cambios que acontecen en la variación genética de poblaciones silvestres de *Phaseolus lunatus* en el Valle Central de Costa Rica, después de la incidencia de perturbaciones que afectan la reproducción y la dinámica poblacional. La

información demográfica recolectada para las poblaciones presentes en el Valle Central sugiere una estructura de metapoblaciones, evidenciada por la ocurrencia de frecuentes eventos de extinción local y recolonización (Degreef *et al.* 1997, Rocha *et al.* 1997, Degreef 1998, Rocha *et al.* 2002). Los resultados de este estudio revelan una compleja dinámica en la estructura genética interna de las poblaciones estudiadas, la cual incluye la pérdida y ganancia de alelos. Estos resultados no sugieren ni descartan la posibilidad de intercambio genético entre las poblaciones, por medio de la migración de polen o de semillas.

**Cuadro 15.** Valores de  $\chi^2$  para el análisis de contingencia correspondiente a los cambios en las frecuencias alélicas para cada locus, en las poblaciones manipuladas. Se indica en cuales casos la variación fue significativa.

Poblaciones Manipuladas	Loci		
	PV-ctt001	PV-at004	PV-at006
Km51(2000-2001)	1,3724	---	---
Km15(2000-2001)	---	1,917	---
Km53(2000-2001)	0,3102	1,89	---
E104(2000-2001)	2,424	0,902	2,288
E25(2000-2001)	1,3824	5,1548**	---

\*\* $P < 0,05$ .

Los niveles de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) obtenidos al comparar de manera general las muestras de distintas poblaciones recolectadas durante el período de 1994-95 y las recolectadas para las mismas poblaciones durante el período 2000-01, coincidieron con los reportados en la literatura para especies de hierbas perennes con sistemas de cruzamiento autógeno o mixto, y con los reportados para plantas anuales predominantemente autógenas, respectivamente (Hamrick y Godt 1989, Heywood 1991). El aumento a nivel temporal en los índices de diferenciación genética entre poblaciones, refleja el efecto que ejercen sobre la estructura genética de la metapoblación, los distintos factores que provocan períodos de extinción local. Los altos valores de diferenciación genética en el tiempo, pueden ser el producto de tamaños efectivos bajos durante los períodos reproductivos y de procesos que afectaron de forma individual a cada una de las poblaciones consideradas.

Morris *et al.* (2002) estudiaron los cambios en el tiempo de la variación genética presente en distintos estratos del banco de semillas y en poblaciones adultas de la hierba perenne endémica de Norteamérica *Astragalus bibullatus*. Los resultados encontrados por los autores, mostraron también un aumento en la diferenciación genética entre poblaciones e inversa a la antigüedad de las muestras. Los autores proponen que el aparente aumento en la endogamia y en los cuellos de botella por los que ha atravesado la especie, disminuyeron el tamaño efectivo de las poblaciones e incrementaron la probabilidad de fijación local de los alelos presentes. Las variaciones observadas en este caso, constituyeron según Morris y

colaboradores (2002), el reflejo de cambios históricos en la estructura genética de la metapoblación. Es decir, estas variaciones son el producto de la reciente fragmentación del hábitat y la disminución del intercambio genético entre poblaciones (Morris *et al.* 2002). El estudio publicado por Morris *et al.* (2002) y este estudio, revelan cambios continuos a lo largo del tiempo en la estructura genética de las poblaciones que integran una metapoblación. La diferenciación genética y la pérdida de diversidad en las poblaciones de una metapoblación dependerían según los resultados obtenidos, del contexto en el cual se establezca la especie y de las condiciones ecológicas que rodean a cada población.

**Diversidad genética en los grupos de poblaciones.** Los niveles de variación genética dentro de las poblaciones han recibido considerable atención ya que estos se consideran indicadores de la viabilidad de la especie y su capacidad de respuesta evolutiva a cambios ambientales (Hamrick y Godt 1989, Heywood 1991, Vrijenhoek 1994, Newman y Pilson 1997, Cruzan 2001). El aumento en la endogamia y la reducción en el número de alelos a causa de la deriva genética, pueden ser motivos de pérdida de viabilidad. Lo que puede ser debido, entre otras causas, a la fijación de alelos deletéreos o por la pérdida de las ventajas adaptativas que representa la heterocigosis (Ellstrand y Elam 1993, Newman y Pilson 1997, Richards 2000, Cruzan 2001).

El análisis de los indicadores utilizados para cuantificar la variación genética interna de las poblaciones estudiadas de *P. lunatus*, sugiere que tanto la cantidad de perturbaciones, como el tiempo transcurrido entre muestreos, influyeron en la magnitud de los cambios observados en las frecuencias alélicas y en el número de alelos presentes en la población. La incidencia de perturbaciones en las poblaciones recolonizadas incrementó en magnitud la variación presentada en las frecuencias alélicas e hizo más frecuente la pérdida o ganancia de alelos en estas poblaciones y en las poblaciones manipuladas, con respecto al grupo de testigos. Estas variaciones en las frecuencias alélicas fueron mayores para el grupo de poblaciones recolonizadas. En todos los grupos estudiados, la diversidad genética encontrada fue distinta para cada locus. La aparición de nuevas variantes alélicas, no registradas en las primeras muestras recolectadas, ocurrió en varias de las poblaciones pertenecientes a los tres grupos de poblaciones estudiados. Sin embargo, en la mayoría de los casos se observó una tendencia a la pérdida de variabilidad genética a lo largo del tiempo. La pérdida de variantes genéticas se manifestó en la disminución del número de alelos efectivos y de las frecuencias de los alelos poco abundantes, y esto fue más común para las poblaciones recolonizadas. La pérdida de diversidad, al considerar la disminución a lo largo del tiempo de la abundancia de heterocigotos dentro de cada población, fue mayor en las poblaciones testigo y en segundo lugar en las poblaciones manipuladas, en comparación con el grupo de poblaciones recolonizadas. Empero,

los valores de  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  obtenidos, sugieren una deficiencia general en las frecuencias genotípicas de heterocigotos, y confirman la presencia de endogamia en las poblaciones estudiadas de frijol Lima en el Valle Central.

La disminución de los niveles de heterocigosis observada en gran parte de las poblaciones de frijol Lima del Valle Central resultó en valores altos en los índices de fijación. Cabe destacar, que el locus con un mayor número de alelos fue también el que mostró un mayor desequilibrio de Hardy-Weinberg. El índice de fijación en el grupo de poblaciones testigos y en las poblaciones manipuladas mantuvo una tendencia a aumentar de un período de muestreo al siguiente. No obstante, la incidencia de perturbaciones o cuellos de botella no parece tener relación con la falta de equilibrio genético en las muestras recolectadas para ambos grupos. Tampoco se observó una relación directa entre el aumento en el índice de fijación y la incidencia de perturbaciones en las poblaciones recolonizadas. Por el contrario estas poblaciones aumentaron los niveles de heterocigosis en las muestras posteriores a la recolonización de los sitios, a pesar de la reducción en las frecuencias de los alelos menos abundantes. Sin embargo, el grupo de poblaciones sometidas a una perturbación aislada (poblaciones manipuladas) no se siguió este mismo patrón. Los grupos de poblaciones testigo y poblaciones manipuladas aumentaron los niveles de endogamia a lo largo del tiempo, provocando un aumento en los índices de fijación. En el grupo de poblaciones recolonizadas la heterocigosis observadas no presentó un patrón claro de variación. Mientras que en las poblaciones manipuladas, tanto esta como la heterocigosis calculada a partir de las frecuencias alélicas, mostraron una clara tendencia a disminuir en las muestras tomadas posteriores a la perturbación. En todos los grupos de poblaciones, la disminución o el aumento en el número esperado de heterocigotos coincidió con la pérdida o ganancia de alelos a lo largo del tiempo. Este fue el caso de las poblaciones E29, E38, J11, E25 Km15 y E104. No obstante, los cambios observados en el número efectivo de alelos ( $n_e$ ) para los distintos grupos de poblaciones, no coincidieron con la variación observada con respecto a la heterocigosis promedio. En general, el número efectivo de alelos disminuyó en el grupo de poblaciones recolonizadas, coincidiendo con la reducción y fijación en las frecuencias de los alelos presentes. Sin embargo, para los grupos de poblaciones testigo y poblaciones manipuladas, este indicador no presentó ningún patrón general que sugiera el aumento o disminución en el tiempo de la diversidad genética presente en las poblaciones.

En un trabajo anterior realizado con isoenzimas en las poblaciones de frijol Lima presentes en el Valle Central de Costa Rica, Maquet *et al.* (1996) reportaron valores menores en los niveles de heterocigosis propuestos para este estudio ( $H_o < 0,02$ ). La diversidad reportada por los autores ( $H = 0,146$  para la especie y  $H = 0,029$  para poblaciones) presenta similitud con los resultados obtenidos en este estudio para la heterocigosis. Sin embargo, la

diferenciación entre las poblaciones estudiadas ( $G_{ST}= 0,803$ ) resultó ser considerablemente mayor a lo reportado en este estudio para los índices de diferenciación entre poblaciones ( $F_{ST}$ ). Resultados similares ( $H_o= 0,006$  y  $F_{ST}= 0,444$ ) a los presentados por Maquet *et al.* (1996) y por este estudio, fueron obtenidos por Bi-Irié (1999). Estos autores concuerdan en afirmar que las poblaciones silvestres de frijol Lima en el Valle Central de Costa Rica son predominantemente endógamas, con niveles de autogamia en términos de especie, cercanos al 90%. Asimismo, coinciden en la necesidad de hacer énfasis en los patrones espaciales de las poblaciones y su relación con la diferenciación de la variación genética observada. Al respecto Bi-Irié (1999) encontró que los polimorfismos genéticos dentro de las poblaciones, se distribuyen de forma no aleatoria.

**Diferenciación genética en el tiempo.** En el grupo de poblaciones recolonizadas, la alta incidencia de perturbaciones originó un mayor cambio en las frecuencias alélicas a lo largo del tiempo y la pérdida de alelos efectivos. Las poblaciones que atravesaron ciclos de extinción y recolonización presentaron los mayores valores de diferenciación genética al comparar las muestras tomadas antes de las perturbaciones con las muestras tomadas de esas mismas poblaciones después de recolonizados los sitios. En general, los índices de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) en estas poblaciones sobrepasaron el umbral de 0,1 considerado para poblaciones con altas tasas de exocruzamiento (con excepción de la población E29); y alcanzaron valores similares a los reportados por Hamrick y Godt (1989) y Heywood (1991) para especies de plantas con hábitos reproductivos predominantemente autógamos. En este caso, los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones restablecidas en años posteriores a un período de extinción local, no necesariamente representan la estructura genética de la población que previamente ocupó dicho sitio. Los resultados parecen indicar que el banco de semillas a partir del cual dicho sitio fue recolonizado, cambió su composición genética a través del tiempo. Este reservorio de germoplasma es posiblemente la principal fuente de plantas para restablecer poblaciones que experimentan severas perturbaciones locales y permite la permanencia de las poblaciones de frijol Lima del Valle Central (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998, Degreef *et al.* 2002, Barrantes 2003).

El aporte de los eventos reproductivos en las poblaciones recolonizadas se vio reflejado en los índices de diferenciación genética de Wright ( $F_{ST}$ ) y en el número efectivo de migrantes ( $N_e m$ ). La población E17 presentó el mayor grado de diferenciación genética ( $F_{ST}>0,6$ ) y fue la menos exitosa en alcanzar los últimos estadios fenológicos y producir semillas. A esto se le podría agregar la mayor duración en su período de inactividad, lo cual sugiere un desgaste mayor en el banco de semillas depositado previamente por la población en dicho sitio. Se podría esperar que la degradación del banco de semillas del suelo en esta población esté

ocurriendo desde antes del inicio de este estudio, como consecuencia de perturbaciones que afectaron su viabilidad y su frecuencia reproductiva en años anteriores a los censos. La población Her2 ( $F_{ST} > 0,25$ ), presentó un pico en la actividad reproductiva previo al período de extinción local. Pero la cantidad de individuos que llegaron a producir semillas fue mínima (solamente 1 individuo registrado). A este hecho se le suma un número muy reducido de individuos en los eventos reproductivos posteriores a la recolonización del sitio lo cual contribuyó posiblemente a incrementar la deriva genética y diferenciación genética en la misma población. La población E38 ( $F_{ST} > 0,15$ ) mostró, con respecto a la Her2, un mayor éxito reproductivo posterior a la recolonización. Más de 20 individuos produjeron y dispersaron semillas en esta población (Apéndice 1). Finalmente, la población recolonizada con mayor éxito reproductivo (E29), fue también la que presentó menor variación en sus frecuencias alélicas y un nivel de diferenciación menor ( $F_{ST} < 0,1$ ). En síntesis, las poblaciones que se restablecieron posterior al período de extinción local no son muestras representativas de las poblaciones presentes antes del año 1995. La frecuencia y abundancia de los eventos reproductivos en estas la poblaciones, se encontraron estrechamente relacionados con la pérdida en la capacidad de mantener la variación genética interna a través del tiempo, como una consecuencia de la no-renovación del banco de semillas.

El grupo de poblaciones testigos presentó valores moderados de diferenciación en su estructura genética a través del tiempo ( $F_{ST}$  promedio  $< 0,1$ ). Si bien en este caso el índice de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) sugiere una baja tasa de cambio en la diversidad genética interna (número de alelos y heterocigosis), el análisis de contingencia realizado indicó que estos cambios, aunque pequeños, fueron significativos. Por otro lado, debido a que los alelos más frecuentes son compartidos por la mayoría de las poblaciones en frecuencias similarmente altas y que estos alelos tienden a ser mayormente representados en las progenies de las poblaciones, el índice de diferenciación genética  $F_{ST}$  puede estar subestimando en este caso, el impacto que sobre la variabilidad genética poblacional causa la pérdida de los alelos menos frecuentes. Por su carácter aleatorio, las variaciones observadas en las frecuencias alélicas de estas poblaciones podrían ser consideradas como una posible consecuencia de la deriva genética dentro de la mismas, o bien que estas aún no alcanzan su estado de equilibrio (Whitlock y McCauley 1990, Mariette *et al.* 1997, Austerlitz *et al.* 2000). Esta tendencia podría desembocar en la fijación o pérdida de algunos alelos en un período de tiempo mayor al estudiado.

En el grupo de poblaciones manipuladas, el cambio en la estructura genética interna de cada una de las poblaciones analizadas fue mínimo. Las poblaciones reestablecidas después de la perturbación fueron muy similares en su estructura genética a aquellas eliminadas en la generación anterior. En este caso, los valores de  $F_{ST}$  se mantuvieron similares a los reportados

en la literatura para poblaciones exógamas, lo cuál sugiere una alta tasa de migración de genes entre las muestras tomadas para este grupo de poblaciones (Hamrick y Godt 1989, Heywood 1991). La presencia de mayor diferenciación en las poblaciones E104 y E25 puede deberse en parte a una sobre expresión de la variación presente en los grupos de individuos no cortados durante la manipulación. Bi-Irié (1999) encontró que los polimorfismos genéticos dentro de las poblaciones de frijol Lima del Valle Central no se distribuyen de forma homogénea dentro de las poblaciones. Los valores obtenidos para el número efectivo de migrantes ( $N_m$ ) en las poblaciones manipuladas, revelaron que una importante fracción de la variación genética de las poblaciones de frijol Lima puede ser recuperada por el banco de semillas depositado en años anteriores a la ocurrencia de alguna perturbación, período de extinción local o ambos. Sin embargo se debe considerar que este último grupo, representa a poblaciones que ven interrumpidos sus períodos reproductivos con muy poca frecuencia.

El trabajo realizado en las poblaciones testigo y en el grupo de poblaciones manipuladas confirmó la importancia del banco de semillas, depositado años atrás, en mantener o reestablecer la estructura genética original de las poblaciones. No obstante, en las poblaciones testigo, el análisis de heterogeneidad mostró que en las poblaciones de *P. lunatus* del Valle Central con altas frecuencias reproductivas pueden darse cambios significativos de la diversidad genética dentro de las mismas. Al comparar muestras tomadas en los mismos sitios pero con varios años de separación, se encontró variación significativa en las frecuencias alélicas de los loci estudiados. De manera contraria, en el grupo de poblaciones manipuladas, el cambio en las frecuencias alélicas entre un año y otro, después de la manipulación experimental, no fue significativo. Sin embargo el potencial amortiguador del banco de semillas como reservorio de genes, fue muy variable entre las poblaciones de este grupo, así lo confirmaron los valores de  $N_m$ .

**Dinámica poblacional y variación genética.** El riesgo de sufrir extinciones locales varía entre especies y entre poblaciones (Stöcklin y Fischer 1999). Varios autores coinciden en advertir que las poblaciones pequeñas son más propensas a ser afectadas significativamente por procesos estocásticos y por ende sufrir extinciones locales (Maruyama y Kimura 1980, Hanski *et al.* 1996, Stöcklin y Fischer 1999). En la mayoría de los casos, el tamaño efectivo de la población no coincide con el tamaño real de ésta (Loveless y Hamrick 1984). Esto es particularmente importante al considerar la diversidad genética de las poblaciones, ya que puede existir una fracción importante de individuos reproductivos que no participan en la reproducción, o bien, están poco representados en la progenie. Como consecuencia de ello, se espera que el tamaño efectivo de las poblaciones en los sistemas de metapoblaciones sea considerablemente bajo dependiendo del número de poblaciones y la cantidad de individuos que las conforman (Gilpin

1991, Wang y Caballero 1999). Las implicaciones obvias incluyen la pérdida de variabilidad genética, tanto en el número de alelos como en la heterocigosis (Nei *et al.* 1975, Gilpin 1991). Además, la diferenciación genética entre poblaciones tiende a incrementarse (Maruyama y Kimura 1980, McCauley 1993, Hasting y Harrison 1994). Este parece ser el caso de las poblaciones silvestres de frijol Lima en el Valle Central. Los resultados obtenidos sugieren que a medida que aumenta la intensidad y frecuencia de los cuellos de botella, la diversidad intrapoblacional (cantidad de heterocigotos) disminuye y las variaciones en el número de alelos presentes son más frecuentes. Empero el panorama general que muestran las poblaciones de frijol Lima sugiere, que aún aquellas que logran producir semillas cada año se encuentran propensas a variaciones en su estructura genética interna por causa de factores aleatorios externos o bien por que estas aún no alcanzan su estado de equilibrio (Whitlock y McCauley 1990, Mariette *et al.* 1997, Austerlitz *et al.* 2000).

Los patrones en la variación genética de las poblaciones de *P.lunatus* del Valle Central sugieren un sistema de metapoblaciones en donde predominan pequeñas agrupaciones de individuos. Distintos autores coinciden que las poblaciones grandes amortiguan con mayor facilidad las fluctuaciones rápidas en las frecuencias alélicas (Hollingsworth y Dickson 1997, Newman y Pilson 1997, Cruzan 2001). Estudios en poblaciones pequeñas (o de tamaños efectivos pequeños) y geográficamente más aisladas han demostrado que los niveles de diferenciación genética, pérdida de variabilidad y aumento en la homocigosis son mayores en estas, en comparación con aquellas de mayor tamaño. Principalmente en especies que atraviesan por cuellos de botella constantes o en los casos donde el establecimiento de la población es dado por unos pocos individuos en sitios aislados (Hollingsworth y Dickson 1997, Newman y Pilson 1997, Cruzan 2001). Así también, la capacidad de mantener o incrementar la variación genética dentro de las poblaciones está estrechamente relacionada con el tamaño que estas mantengan y las tasa de intercambio genético con poblaciones vecinas (Hollingsworth y Dickson 1997, Cruzan 2001). En resumen, el aislamiento genético combinado con el reducido número de individuos característicos de las poblaciones de frijol Lima, indica que estas se encuentran más expuestas a sufrir pérdida de alelos a causa de la deriva genética.

Bajo un escenario similar, Cruzan (2001) determinó que la pérdida de variación en las poblaciones geográficamente aisladas de *Scutellaria montana* era debida a los procesos de extinción local y a la pérdida de flujo genético entre poblaciones; esto como una consecuencia de la fragmentación de su hábitat. Rocha *et al.* (1997) proponen que las poblaciones de frijol Lima en el Valle Central atraviesan por constantes procesos de extinción, fusión y fisión. Adicionalmente la información demográfica recopilada, demuestra que los procesos de extinción y recolonización en las poblaciones de *P.lunatus* son frecuentes. Se evidenció, que un número importante de poblaciones no alcanzan a concluir sus ciclos reproductivos (Barrantes 2003).

Los resultados indicaron que la variación genética en las poblaciones que sufren perturbaciones constantes se ve grandemente afectada si la reproducción dentro de las mismas es poca, posiblemente como consecuencia del agotamiento del banco de semillas del suelo o la disminución de su tamaño efectivo, sumado a la pérdida de variación genética por mortalidad de la población vegetativa. Esto confirma la importancia del banco de semillas del suelo y de los eventos reproductivos frecuentes, en el mantenimiento y conservación de la variabilidad genética intrapoblacional.

El flujo genético entre poblaciones (migración de polen principalmente) ha demostrado ser un elemento importante en el rescate de la variación genética y en la prevención del distanciamiento genético de las poblaciones que conforman metapoblaciones (Apsit *et al.* 2001, Rocha y Aguilar 2001a, Rocha y Aguilar 2001b). La llegada de semillas desde poblaciones vecinas incrementa el flujo genético entre estas y puede amortiguar el efecto de las perturbaciones que reducen la reproducción (Ebenhard 1991, Thrall *et al.* 1997, Cain *et al.* 2000). En otros casos, una emigración muy alta de semillas puede traer costos reproductivos adicionales para las poblaciones activas (Ebenhard 1991, Hanski *et al.* 1996). La dispersión de semillas a largas distancias no ha sido documentada en el frijol Lima del Valle Central. Los posibles agentes dispersores (mamíferos, aves, viento, agua o insectos) no han sido identificados con claridad. Estudios anteriores indican que el movimiento de propágulos a distancias cortas o medias es debido principalmente a la apertura explosiva de las vainas, al perder estas toda su humedad durante la estación seca (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998, Bi Irié 1999). Con la información recopilada, tampoco fue posible determinar si los cambios drásticos en las frecuencias alélicas de las poblaciones recolonizadas, fueron una consecuencia de la migración de semillas desde poblaciones vecinas, debido a la amplia distribución de los mismos alelos entre la mayoría de las poblaciones. Sin embargo la aparición de algunas variantes nuevas, que no se encontraban presentes en las muestras iniciales (poblaciones E17, E38 y J11 principalmente, y E104 en menor magnitud) no permiten descartar dicha posibilidad.

Varios autores coinciden en afirmar que los bancos de semillas cumplen una función trascendental en la recuperación de las poblaciones (Stöcklin y Fischer 1999, Nunney 2002). Dependiendo de su tamaño, estos actúan como reservorio de la variabilidad genética ante la incidencia de cuellos de botella. Reducen el impacto que los cambios estocásticos ejercen sobre el tamaño efectivo de la población y la variación genética; y constituyen una fuente latente de colonizadores ante extinciones locales (Kalisz y McPeck 1993, Morris *et al.* 2002). Debido a su vulnerabilidad a frecuentes o continuos períodos de baja reproducción, las especies anuales se adaptaron a desarrollar semillas de dormancias variables (Nunney 2002). Esta misma adaptación ha permitido a especies que colonizan hábitat inestables permanecer en estos por largos períodos de tiempo. Degreef *et al.* (1997) proponen que las poblaciones silvestres de

*P.lunatus* en el Valle Central, se caracterizan por una alta fecundidad y a su vez por una alta mortalidad. Su estrategia de colonización es oportunista, llegando a ocupar con frecuencia sitios poco favorables (Degreef *et al.* 1997). Pero al mismo tiempo, la deposición de un banco de semillas le permite a la especie, recolonizar dichas áreas luego de atravesar períodos con una alta mortalidad de individuos (Degreef *et al.* 2002).

Esta dinámica que mantiene estables las poblaciones de frijol Lima y las caracteriza como metapoblación, posee un componente substancial de migración a través del tiempo. Según Degreef (1998) las semillas remanentes en el suelo pueden permanecer dormantes hasta por 3 años. No obstante los datos recolectados por el autor indican que la mayoría de éstas germinan en el primer año luego de ser dispersadas (70% a 84%). Mientras que al tercer año posterior a su dispersión habrán germinado el 99% de las semillas depositadas durante el primer año (Degreef *et al.* 1997, Degreef 1998). Los resultados mostrados en este estudio confirman que la renovación frecuente de este reservorio es fundamental para mantener estable la variación genética dentro de las poblaciones silvestres de *P.lunatus*

Este banco de semillas previene la extinción de genotipos a pesar de períodos de alta mortalidad y ausencia de reproducción (Degreef *et al.* 2002). El período de seguimiento realizado en las poblaciones silvestres de frijol Lima, permitió identificar a aquellas donde las perturbaciones continuas llevaron al borde del agotamiento el banco de semillas (extinciones). Sin embargo, este mismo período resultó ser demasiado corto para identificar la magnitud de los cuellos de botella (mortalidad de individuos potencialmente reproductivos), principalmente si se considera la duración que puede alcanzar la dormancia en las semillas. Se puede suponer, como en el caso de la población E17, que períodos de inactividad mayores a un año son indicativos de una mínima reproducción en los años anteriores, y que casos como este reflejan las condiciones extremas a las que pueden estar sometidas las poblaciones que logran recuperarse después de un episodio de extinción local. Es decir, se puede afirmar en este caso que la magnitud del impacto del período de extinción puede ser reflejo del número de años reproductivamente desfavorables (Kalisz y McPeck 1993).

Este estudio sugiere la importancia del banco de semillas del suelo como fuente de colonización y reservorio de la variabilidad genética en las poblaciones estudiadas de *P.lunatus*. Pero más importante, evidencia los efectos que sobre la variabilidad genética de estas poblaciones, ejercen los eventos de extinción local y las perturbaciones causantes de alta mortalidad y bajas tasas de reproducción. Los datos recolectados indican que la variación genética presente en las poblaciones de frijol Lima, puede encontrarse en riesgo de reducirse si se combinan los escasos eventos reproductivos con la disminución en el número de individuos que aportan semillas al banco del suelo.

## APÉNDICE 1

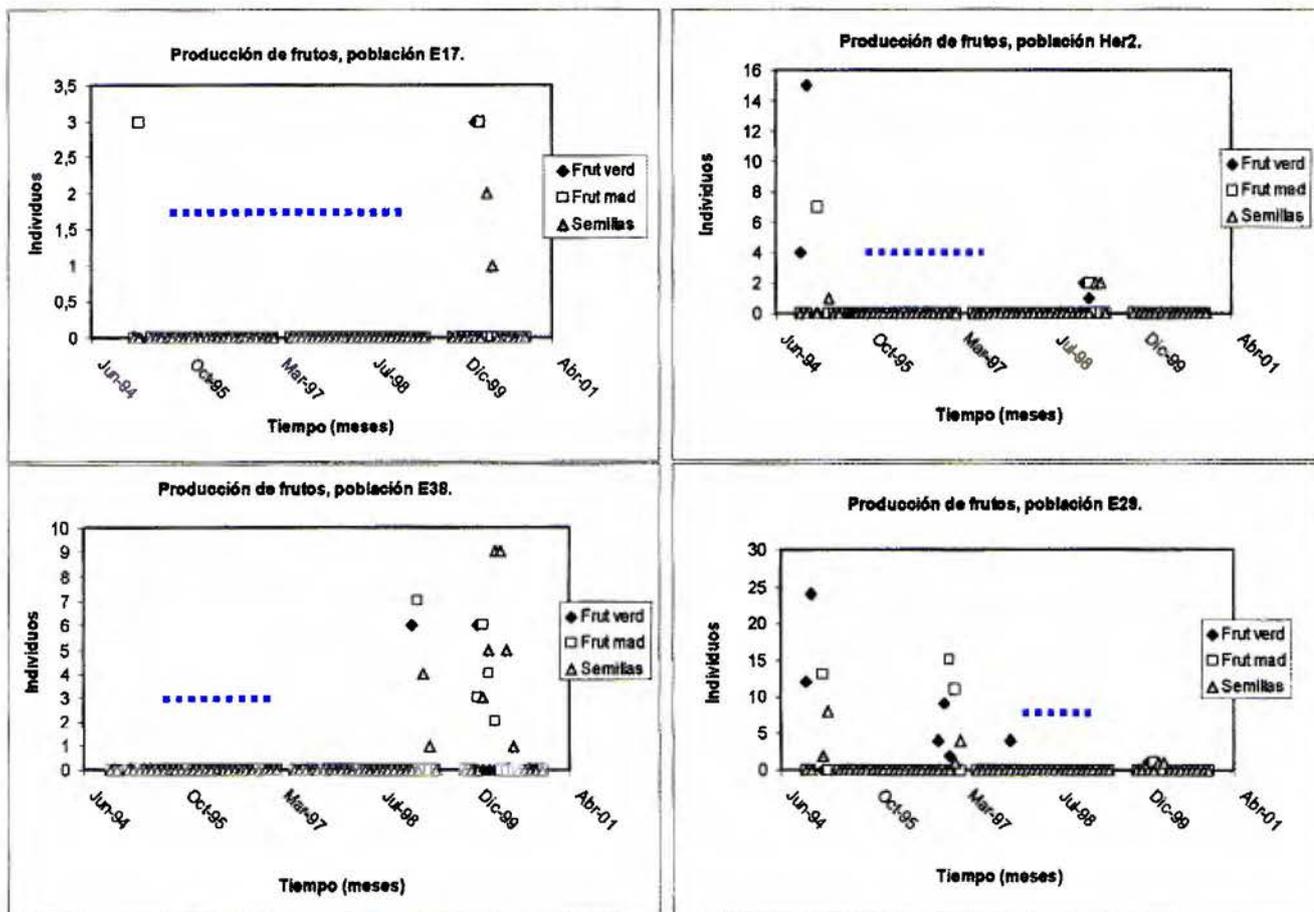


Figura 1. Eventos reproductivos en las poblaciones recolonizadas. Las líneas punteadas corresponden a los períodos de inactividad (extinción local) de la población.

## Bibliografía PARTE 2

Álvarez-Buylla, E.R., García-Barrios, R., Lara-Moreno, C. and Martínez-Ramos, M. 1996. **Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 387-421.

Apsit, V.J., Hamrick, J.L. and Nason, J.D. 2001. **Breeding population size of a fragmented population of a Costa Rican Dry Forest tree species.** *The American Genetic Association.* 92: 415-420.

Austerlitz, F., Mariette, S., Machon, N., Gouyon, P.H. and Godelle, B. 2000. **Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species.** *Genetics.* 154: 1309-1321

Barrantes A, D. 2003 **Dinámica de extinciones locales y colonización de poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en el Valle Central de Costa Rica.** En preparación, capítulo primero.

Bi Irié, Zoro. 1999. **Variabilité génétique des populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. dans la vallée centrale du Costa Rica et ses implications dans la mise au point d'une stratégie de conservations *in situ*.** Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Bélgica. 194pp

Cain, M.L., Milligan, B.G. and Strand, A.E. 2000. **Long-seed dispersal in plant populations.** *American Journal of Botany.* 87(9):1217-1227.

Cruzan, M. 2001. **Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria Montana* (Lamiaceae).** *Evolution.* 55(8): 1569-1580.

Degreef, J. 1998. **Développement d'un modèle démographique et applications à la conservations *in situ* au populations sauvages de haricot de Lima (*Phaseolus lunatus* L.) dans la vallée centrale du Costa Rica.** Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Bélgica. 191pp

Degreef, J., Baudouin, J.P. and Rocha, O.J. 1997. **Case studies on breeding systems and consequences for germplasm conservation 2. Demography of wild Lima bean populations in Central Valley of Costa Rica.** *Genetic Resources and Crop Evolution.* 44:429-438.

Degreef, J., Rocha, O.J., Vanderborght, T. and Baudouin, J.P. 2002. **Soil seed bank and seed dormancy in wild populations of Lima beans (Fabaceae): considerations for *in situ* and *ex situ* conservation.** *American Journal of Botany* 89(10):1644-1650.

Dirección General de Estadística y Censos. 1953. **Censo Agropecuario 1950.** Ministerio Economía y Hacienda. Costa Rica. 315pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1974. **Censos Nacionales de 1973, Agropecuario.** Ministerio de Hacienda, 2ª ed 1975. Costa Rica. 286pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1975. **Censo de Población de Costa Rica, 22 de mayo de 1950.** Ministerio de Hacienda, 2ª ed. Costa Rica. 42-99pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1987. **Censo Agropecuario 1984.** Ministerio de Hacienda, 2ª ed 1975. Costa Rica. 315pp

Ebenhard, T. 1991. **Colonization in metapopulations: a review of theory and observations.** *Biological Journal of the Linnean Society.* 42:105-121

Ellstrand, N.C and Elam, D.R. 1993. **Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24:217-242.

- Gilpin, M. 1991. **The genetic effective size of a metapopulation.** *Biological Journal of the Linnean Society.* 42:165-175.
- González, D.O., Palacios, N., Gallego, C. y Tohme, J. 1995. **Protocolos para Marcadores Moleculares, Unidad de Investigación en Biotecnología.** Centro de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 81pp
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. 1989. **Allozyme diversity in plant species.** En: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L and Weir, B.S. 1989. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources.** Sinauer Associates Inc. pp43-63.
- Hanski, I., Mielane, A., and Gyllenber, M. 1996. **Minimum variable metapopulation size.** *The American Naturalist.* 147(4):527-541
- Hansson, L. 1991. **Dispersal and connectivity in metapopulations.** *Biological Journal of the Linnean Society.* 42:89-103.
- Harding, K.C. and McNamara, J.M. 2002. **A unifying framework for metapopulation dynamic.** *The American Naturalist.* 160(2): 173-185.
- Hastings, A. and Harrison, S. 1994. **Metapopulation dynamics and genetics.** *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 25:167-188.
- Heywood, J.S. 1991. **Spatial analysis of genetic variation in plant populations.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 335-355.
- Hollingsworth, P.M. and Dickson, J.H.1997. **Genetic variation in rural and urban populations of *Epipactis helleborine* (L.) Crantz. (Orchidaceae) in Britain.** *Botanical Journal of the Linnean Society.* 123:321-331.
- Husband, B.C. and Barrett, S.C.H. 1996. **A metapopulation perspective in plant population biology.** *Journal of Ecology.* 84:461-469.
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) 2001. **IX Censo Nacional de Población y Vivienda, Resultados Generales, Costa Rica agosto 2001.** INEC. 80pp
- James, T., Vege, S. Aldrich, P. and Hamrick, J.L. 1998. **Mating Systems of Three Tropical Dry Forest Tree Species.** *Biotropica.* 30(4): 587-594.
- Kalish, S. and McPeck, M.A. 1993. **Extinction dynamics, populations grow and seed banks: an example using an age-structured annual.** *Oecologia* 95:314-320.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1994. **A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and vitis species.** *Plant Molecular Biology Reporter.* 12 (1): 6-13.
- Loveless, M.D. and Hamrick, J.L. 1984. **Ecological determinants of genetic structure in plant populations.** *Ann Rev. Ecol. Syst.* 15:65-95.
- Maquet, A., Vekemans, X. and Baudoin, J. P. 1999. **Phylogenetics study on wild allies of Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin.** *Plant systematics and evolution.* 218: 43-54.
- Maquet, A., Zoro Bi, I., Rocha, O.J. and Baudoin, J.P. 1996. **Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation 1.Isoenzyme diversity in wild Lima bean populations in central Costa Rica.** *Genetic Resources and Crop Evolution.* 43: 309-318.
- Mariette, S., Lefranc, M., Legrand, P., Taneyhill, D., Frascaria-Lacoste, N. and Machon, N. 1997. **Genetic variability in wild cherry populations in France: effects of colonization processes.** *Theoretical and Applied Genetics.* 94: 904-908.

Maruyama, T. and Kimura, M. 1980. **Genetic variability and effective population size when local extinctions and recolonization of subpopulation are frequent.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77(11): 6710-6714.

McCauley, D.E. 1993. **Evolution in metapopulations with frequent local extinction and recolonization.** En: Futuyama, D. and Antonovics J. 1993. **Oxford Surveys in Evolutionary Biological.** Edit Oxford Univ. Press. pp109-134.

Morris, A.B., Baucom, R.S. and Cruzan, M.B. 2002. **Stratified analysis of the soil seed bank in the cedar glade endemic *Astragalus bibullatus*: evidence for historical changes in genetic structure.** American Journal of Botany. 89(1): 29-36.

Nei, M., Maruyama, T. and Chakraborty, R. 1975. **The bottleneck effect and genetic variability in populations.** Evolution. 29(1):1-10.

Newman, D. and Pilson, D. 1997. **Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*.** Evolution. 51(2): 354-362

Nunney, L. 2002. **The effective size of annual plant population: The interaction of a seed bank with fluctuating population size in maintaining genetic variation.** The American Naturalist. 160(2): 195-204.

Richards, C.M. 2000. **Inbreeding depression and genetic rescue in a plant metapopulation.** The American Naturalist. 155(3):383-394.

Rocha, O.J., Degreef, J., Barrantes, D., Castro, E., Macaya, G. and Guarino, L. 2002. **Metapopulation dynamic of Lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica.** En: M.M. Engels, J., Ramanatha Rao, V., H.D. Brown, A. and Jackson, M.T. 2002. **Managing plant genetic diversity.** CABI Publishing. (IPGRI) Italy. pp205-215.

Rocha, O.J. and Aguilar, G. 2001a. **Variation in the breeding behavior of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica.** American Journal of Botany. 88(9): 1600-1606.

Rocha, O.J. and Aguilar, G. 2001b. **Reproductive biology of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica: a comparison between trees left in pastures and trees in continuous forest.** American Journal of Botany. 88(9): 1607-1614.

Rocha, J.O., Macaya, G., and Baudoin, J.P. 1997. **Causes of local extinction and recolonization determined by 3 year of monitoring wild populations of *Phaseolus lunatus* L. in the Central Valley of Costa Rica.** Plant Genetics Resources Newsletter. 112:44-48

Stöcklin, J. and Fischer, M. 1999. **Plants with longer-lived seeds gave lower local extinction rates in grassland remnants 1950-1985.** Oecologia. 120: 539-543.

Thrall, P.H., Richards, C.M., McCauley, D.E. and Antonovics, J. 1997. **Metapopulation Collapse: The consequences of limited gene-flow in spatially structures populations.** En: Bascompte, J. and Solé, R.V. 1997. **Modeling Spatiotemporal Dynamics in Ecology.** Edit Landes Bioscience. pp79-100

Vrijenhoek, R.C. 1994. **Genetic diversity and fitness in small populations.** En: Loescheke, V., Tomiuk, J. and Jain, S.K. 1994. **Conservation Genetics.** Birkhauser Verlag Basel. Switzerland. pp37-53.

Wang, J. and Caballero, A. 1999. **Development in predicting the effective size of subdivided population.** Heredity. 82:212-226.

Whitlock, M.C. and McCauley, D.E. 1990. **Some population genetic consequences of colony formation and extinction: genetic correlation within founding groups.** Evolution 44(7): 1717-1724.

Yu, K., Park, S.J., Poysa, V. and Gepts, P. 2000. **Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** The Journal of Heredity. 91(6): 429-434.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez-Buylla, E.R., García-Barrios, R., Lara-Moreno, C. and Martínez-Ramos, M. 1996. **Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 387-421

Apsit, V.J., Hamrick, J.L. and Nason, J.D. 2001. **Breeding population size of a fragmented population of a Costa Rican Dry Forest tree species.** *The American Genetic Association.* 92: 415-420.

Austerlitz, F., Mariette, S., Machon, N., Gouyon, P.H. and Godelle, B. 2000. **Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species.** *Genetics.* 154: 1309-1321

Baudoin, J.P. 1988. **L'amélioration de *Phaseolus lunatus* L. en zones tropicales, Taxonomie, origine et évolution du genre *Phaseolus* et de l'espèce étudiée.** *Bull. Rech. Agron. Gembloux.* 23(3): 237-260.

Baudoin, J.P. 1989. **L'amélioration de *Phaseolus lunatus* L. en zones tropicales, Ecologie et physiologie.** *Bull. Rech. Agron. Gembloux.* 24(1), 5-32.

Bi Irié, Zoro. 1999. **Variabilité génétique des populations sauvages de *Phaseolus lunatus* L. dans la vallée centrale du Costa Rica et ses implications dans la mise au point d'une stratégie de conservations *in situ*.** Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Belgique. 194pp

Cain, M.L., Milligan, B.G. and Strand, A.E. 2000. **Long-seed dispersal in plant populations.** *American Journal of Botany.* 87(9):1217-1227.

Caswell, H. 1989. **Matrix population models.** Sinauer Associates Inc. E.E.U.U. 328pp

Cruzan, M. 2001 **Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria Montana* (Lamiaceae).** *Evolution.* 55(8): 1569-1580.

Degreef, J. 1998. **Développement d'un modèle démographique et applications à la conservations *in situ* au populations sauvages de haricot de Lima (*Phaseolus lunatus* L.) dans la vallée centrale du Costa Rica.** Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Belgique. 191pp

Degreef, J., Baudouin, J.P. and Rocha, O.J. 1997. **Case studies on breeding systems and consequences for germplasm conservation 2. Demography of wild Lima bean populations in Central Valley of Costa Rica.** *Genetic Resources and Crop Evolution.* 44:429-438.

Degreef, J., Rocha, O.J., Vanderborcht, T. and Baudouin, J.P. 2002. **Soil seed bank and seed dormancy in wild populations of Lima beans (Fabaceae): considerations for *in situ* and *ex situ* conservation.** *American Journal of Botany* 89(10):1644-1650.

Dirección General de Estadística y Censos. 1953. **Censo Agropecuario 1950.** Ministerio Economía y Hacienda. Costa Rica. 315pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1974. **Censos Nacionales de 1973, Agropecuario.** Ministerio de Hacienda, 2ª ed 1975. Costa Rica. 286pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1975. **Censo de Población de Costa Rica, 22 de mayo de 1950.** Ministerio de Hacienda, 2ª ed. Costa Rica. 42-99pp

Dirección General de Estadística y Censos. 1987. **Censo Agropecuario 1984.** Ministerio de Hacienda, 2ª ed 1975. Costa Rica. 315pp

Ebenhard, T. 1991. **Colonization in metapopulations: a review of theory and observations.** *Biological Journal of the Linnean Society.* 42:105-121

Ellstrand, N.C and Elam, D.R. 1993. **Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24:217-242.

Evans, L.T. 1993. **Crop Evolution, Adaptation and Yield.** Cambridge University Press. 500pp (62-112)

Ford-Lloyd, B. and Jackson, M. 1986. **Plant Genetic Resources.** Edward Arnold Pub. Great Britain. 149 pp

Frankel, O.H., Brown, A.H.D. and Burdon, J.J. 1995. **The Conservations of Plant Biodiversity.** Cambridge University Press. 299pp.

Gillman, M. 1997. **Plant population ecology.** En: Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V. and Hawkes, J.G. 1997. **Plant genetic conservation: the *in situ* approach.** Chapman and Hall. E.E.U.U. pp114-131.

Gilpin, M. 1991. **The genetic effective size of a metapopulation.** *Biological Journal of the Linnean Society.* 42:165-175.

González, D.O., Palacios, N., Gallego, C. y Tohme, J. 1995. **Protocolos para Marcadores Moleculares, Unidad de Investigación en Biotecnología.** Centro de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 81pp

Guarino, L., Rao, V.R. and Reid, R. 1995. **Collecting Plant genetic Resources.** CAB International. Wallingford. 748 pp

Hamrick, J.L: and Godt, M.J.W. 1989. **Allozyme diversity in plant species.** En: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L and Weir, B.S. 1989. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources.** Sinauer Associates Inc. pp43-63.

Hanski, I., Mielane, A., and Gyllemer, M. 1996. **Minimum variable metapopulation size.** *The American Naturalist.* 147(4):527-541.

Hansson, L. 1991. **Dispersal and connectivity in metapopulations.** *Biological Journal of the Linnean Society.* 42:89-103.

Harding, K.C. and McNamara, J.M. 2002. **A unifying framework for metapopulation dynamic.** *The American Naturalist.* 160(2): 173-185.

Hastings, A. 1991. **Structure models of metapopulation dynamics.** *Biological Journal of the Linnean Society.* 42:57-71.

Hastings, A. and Harrison, S. 1994. **Metapopulation dynamics and genetics.** *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 25:167-188.

Hess, G.R. 1996a. **Linking extinction to connectivity and habitat destruction in metapopulation models.** *The American Naturalist.* 148(1):226-236

Hess, G. 1996b. **Disease in metapopulation models: implication for conservation.** *Ecology.* 77(5):1617-1632.

Heywood, J.S. 1991. **Spatial analysis of genetic variation in plant populations.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 335-355.

Hollingsworth, P.M. and Dickson, J.H.1997. **Genetic variation in rural and urban populations of *Epipactis helleborine* (L.) Crantz. (Orchidaceae) in Britain.** *Botanical Journal of the Linnean Society.* 123:321-331.

Husband, B.C. and Barrett, S.C.H. 1996. **A metapopulation perspective in plant population biology.** *Journal of Ecology.* 84:461-469.

INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) 2001. **IX Censo Nacional de Población y Vivienda, Resultados Generales, Costa Rica agosto 2001**. INEC. 80pp

James, T., Vege, S. Aldrich, P. and Hamrick, J.L. 1998. **Mating Systems of Three Tropical Dry Forest Tree Species**. *Biotropica*. 30(4): 587-594.

Kaplan, L. 1973. **Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*) from an Intermontane Peruvian Valley**. *Science*. vol: 179. paj 76-77.

Kalisz, S. 1992. **Demographic of an age-structured annual: Resample projection matrices, elasticity analyses, and seed bank effects**. *Ecology*. 73(3): 1082-1093.

Kalisz, S. and McPeck, M.A. 1993. **Extinction dynamics, populations grow and seed banks: an example using an age-structured annual**. *Oecologia* 95:314-320.

Legendre, S. and Clobert, J. 1995. **ULM, a software for conservation and evolutionary biology**. *Journal of Applied Statistics*. 22, 817-834.

Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1994. **A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and vitis species**. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12 (1): 6-13.

Loveless, M.D. and Hamrick, J.L. 1984. **Ecological determinants of genetic structure in plant populations**. *Ann Rev. Ecol. Syst.* 15:65-95.

Maquet, A., Vekemans, X. and Baudoin, J. P. 1999. **Phylogenetics study on wild allies of Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae), and implications on its origin**. *Plant systematics and evolution*. 218: 43-54.

Maquet, A., Zoro Bi, I., Rocha, O.J. and Baudoin, J.P. 1996. **Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation 1.Isoenzyme diversity in wild Lima bean populations in central Costa Rica**. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 43: 309-318.

Mariette, S., Lefranc, M., Legrand, P., Taneyhill, D., Frascaria-Lacoste, N. and Machon, N. 1997. **Genetic variability in wild cherry populations in France: effects of colonization processes**. *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 904-908.

Maruyama, T. and Kimura, M. 1980. **Genetic variability and effective population size when local extinctions and recolonization of subpopulation are frequent**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77(11): 6710-6714.

McCauley, D.E. 1993. **Evolution in metapopulations with frequent local extinction and recolonization**. En: Futuyma, D. and Antonovics J. 1993. *Oxford Surveys in Evolutionary Biological*. Edit Oxford Univ. Press. pp109-134.

Morris, A.B., Baucom, R.S. and Cruzan, M.B. 2002. **Stratified analysis of the soil seed bank in the cedar glade endemic *Astragalus bibullatus*: evidence for historical changes in genetic structure**. *American Journal of Botany*. 89(1): 29-36.

Nei, M., Maruyama, T. and Chakraborty, R. 1975. **The bottleneck effect and genetic variability in populations**. *Evolution*. 29(1):1-10.

Newman, D. and Pilson, D.1997. **Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella***. *Evolution*. 51(2): 354-362

Nunney, L. 2002. **The effective size of annual plant population: The interaction of a seed bank with fluctuating population size in maintaining genetic variation**. *The American Naturalist*. 160(2): 195-204.

Potter, C.S., Cohen, J.I. and Janczewski, D. 1993. **Perspectives on Biodiversity: case studies of genetic resources conservation and development**. AAAS Press. Washington. 245pp.

- Persal, D.M. 1992. **The origins of plant cultivations in South America**. En Cowan, W.C. and Watson, P.J. 1992. **The origins of agriculture; an international perspective**. Smithsonian Institution Press. Washington. 224pp (173-205)
- Primack, R.B. 1998. **Essentials of conservation Biology**. 2<sup>o</sup> ed. Sinauer Assoc. E.E.U.U. 660pp (378-393)
- Quintana-Ascencio, P.F. and Menges, E.S. 1996. **Inferring metapopulation dynamics from patch-level incidence of Florida scrub plants**. *Conservation Biology*. 10(4):1210-1219.
- Richards, C.M. 2000. **Inbreeding depression and genetic rescue in a plant metapopulation**. *The American Naturalist*. 155(3):383-394.
- Rocha, O.J., Degreef, J., Barrantes, D., Castro, E., Macaya, G. and Guarino, L. 2002. **Metapopulation dynamic of Lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica**. En: M.M. Engels, J., Ramanatha Rao, V., H.D. Brown, A. and Jackson, M.T. 2002. **Managing plant genetic diversity**. CABI Publishing. (IPGRI) Italy. pp205-215.
- Rocha, O.J. and Aguilar, G. 2001a. **Variation in the breeding behavior of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica**. *American Journal of Botany*. 88(9): 1600-1606.
- Rocha, O.J. and Aguilar, G. 2001b. **Reproductive biology of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica: a comparison between trees left in pastures and trees in continuous forest**. *American Journal of Botany*. 88(9): 1607-1614.
- Rocha, J.O., Macaya, G., and Baudoin, J.P. 1997. **Causes of local extinction and recolonization determined by 3 year of monitoring wild populations of *Phaseolus lunatus* L. in the Central Valley of Costa Rica**. *Plant Genetics Resources Newsletter*. 112:44-48
- Smith, Bruce D. 1995. **The origins of agriculture in the Americas**. *Evolutionary anthropology*. 3: 174-184.
- Stöcklin, J. and Fischer, M. 1999. **Plants with longer-lived seeds gave lower local extinction rates in grassland remnants 1950-1985**. *Oecologia*. 120: 539-543.
- Thrall, P.H., Richards, C.M., McCauley, D.E. and Antonovics, J. 1997. **Metapopulation Collapse: The consequences of limited gene-flow in spatially structures populations**. En: Bascombe, J. and Solé, R.V. 1997. **Modeling Spatiotemporal Dynamics in Ecology**. Edit Landes Bioscience. pp79-100
- Vargas, E.M., Macaya, G., Baudoin, J.P. and Rocha, O.J. 2000. **Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation: 3. Electrophoretic mobility of phaseolins in wild populations of lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the central valley of Costa Rica**. *Genetic Resources and crop evolution*. 00: 1-12.
- Vargas Barrantes, E.M. 1997. **Variación morfológica y bioquímica en poblaciones silvestres de frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) del Valle Central de Costa Rica**. Tesis para optar por el grado de Magister Scientiae en Biología. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Costa Rica. 90pp.
- Vrijenhoek, R.C. 1994. **Genetic diversity and fitness in small populations**. En: Loescheke, V., Tomiuk, J. and Jain, S.K. 1994. **Conservation Genetics**. Birkhauser Verlag Basel. Switzerland. pp37-53.
- Wang, J and Caballero, A. 1999. **Development in predicting the effective size of subdivided population**. *Heredity*. 82:212-226.
- Whitlock, M.C. and McCauley, D.E. 1990. **Some population genetic consequences of colony formation and extinction: genetic correlation within founding groups**. *Evolution* 44(7): 1717-1724.
- Yu, K., Park, S.J., Poysa, V. and Gepts, P. 2000. **Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. *The Journal of Heredity*. 91(6): 429-434.