



Foto: Enrico Niccolodi/Agencia PMA

# Genética

## Genetics

Fabrizio R. Santos  
Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil  
Postgraduate Program in Genetics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Helen M.D.R. Barros  
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil  
Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Marco A.A. Schetino & Camilla S. Lima  
Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil  
Postgraduate Program in Genetics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil



Foto: Bruno Azevedo/Arquivo FAP

## Genética da conservação e marcadores moleculares *Conservation genetics and molecular markers*

A genética da conservação é uma disciplina científica que incorpora o estudo de variantes hereditárias, genotípicas ou fenotípicas à pesquisa da biologia da conservação, com a finalidade de gerar conhecimento sobre a diversidade populacional para a elaboração de estratégias que visem a conservação de espécies e ecossistemas.

Atualmente, estudos de história natural de espécies e suas populações nativas fornecem alguns dos principais subsídios que são utilizados para determinar prioridades e estratégias de conservação da biodiversidade. Os dados genéticos de espécies ameaçadas permitem compreender a dinâmica evolutiva de suas populações naturais, a qual deve ser mantida ou restaurada para mitigar os efeitos antropogênicos e garantir a persistência destas populações na natureza em médio e longo prazo. Por exemplo, dados sobre parentesco, diversidade genética remanescente, tamanho efetivo e níveis de endogamia são parâmetros importantes para estimar a viabilidade das populações na natureza e minimizar problemas devido à depressão endogâmica. Outros dados interpoblacionais, como fluxo gênico, estrutura genética ao longo da distribuição espacial da espécie, padrões filogeográficos e adaptações genéticas locais permitem planejar estratégias apropriadas de translocação de indivíduos de acordo com a dinâmica evolutiva das populações, as quais permitem aumentar a diversidade genética local e minimizar outros efeitos negativos como a depressão exogâmica.

Nos estudos de genética da conservação da biodiversidade, o DNA mitocondrial (DNAMt) tem sido muito utilizado desde o final da década de 1980. Por ser uma molécula circular simples, portadora de vários genes em um arranjo estável, sem DNA repetitivo, introns ou pseudogenes, de rápida evolução, herdado uniparentalmente (via materna), sem recombinação e virtualmente haploide, o DNAMt oferece diversas vantagens no estudo da história natural das espécies e de suas populações (AVISE et al., 1987; FRANKHAM, BALLOU, BRISCOE et al., 2008). Além disso, diferentes regiões codificadoras e não codificadoras podem ser escolhidas, adequando a taxa evolutiva requerida à profundidade temporal a ser investigada. Geralmente, a região controladora ou HVSI do DNAMt é de evolução rápida, portanto, útil para investigar eventos recentes (intraespecíficos), enquanto genes codificadores de proteínas, como o Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI), são úteis em estudos interespecíficos. Por essas características, o DNAMt tem sido também muito utilizado em estudos de biogeografia histórica por meio de análises filogeográficas e de genética populacional. Os resultados filogeográficos permitem compreender a dinâmica evolutiva de linhagens genéticas (ou haplótipos), no tempo e no espaço, a qual está associada aos eventos de divergência populacional, às flutuações demográficas e ao padrão de fluxo gênico interpoblacional que moldaram a distribuição da diversidade genética atual de cada espécie.

Atualmente, várias abordagens alternativas em genética são possíveis com o aumento do conhecimento dos genomas. Isto permite o desenvolvimento de novos marcadores moleculares que complementam e refinam as análises feitas com DNAMt nas diferentes escalas temporais. Entre estes marcadores, os mais

Conservation genetics is a scientific discipline that incorporates the study of hereditary variants, genotypic or phenotypic, to conservation biology research, with the purpose of generating knowledge about population diversity for the elaboration of strategies aimed at the conservation of species and ecosystems.

Currently, studies of the natural history of species and their native populations provide major subsidies to determine priorities and strategies for biodiversity conservation. Genetic data from threatened species bring an understanding about the evolutionary dynamics of their natural populations, which must be maintained or restored to mitigate anthropogenic effects and guarantee the persistence of these populations in nature in the medium and long terms. For example, data on kinship, remaining genetic diversity, effective size and inbreeding levels are important parameters to estimate the viability of populations in nature and minimize problems due to inbreeding depression. Other inter-population data, such as gene flow, genetic structure along the species' spatial distribution, phylogeographic patterns and local genetic adaptations, permit the planning of appropriate strategies for the translocation of individuals according to the evolutionary dynamics of populations, which result in increased local genetic diversity and minimize other negative effects, such as outbreeding depression.

In studies of genetics for biodiversity conservation, the mitochondrial DNA (mtDNA) has been widely used since the end of the eighties. For being a simple circular molecule, carrier of several genes in a stable arrangement, without repetitive DNA, introns or pseudogenes, of rapid evolution, inherited uniparentally (maternally), without recombination and virtually haploid, the mtDNA offers several advantages in the study of the natural history of species and their populations (AVISE et al., 1987; FRANKHAM, BALLOU, BRISCOE et al., 2008). In addition, different coding and non-coding regions can be chosen, adjusting the evolutionary rate required to the temporal depth to be investigated. Usually, the mtDNA control region, or the HVSI is fast evolving, therefore, useful to investigate recent events (intraspecific), while protein coding genes, such as the cytochrome c oxidase subunit I (COI), are useful in interspecific studies. For these characteristics, the mtDNA has also been widely used in historical biogeography studies through phylogeographic and population genetics analysis. The phylogeographic results reveal the evolutionary dynamics of genetic lineages (or haplotypes), in time and space, which is associated to population divergence events, demographic fluctuations and the inter-population gene flow pattern that shaped each species' current genetic diversity distribution.

Currently, several alternative approaches in genetics are possible with the increased knowledge of the genomes. This allows the development of new molecular markers that complement and refine the analysis of mtDNA in different time-scales. Among these markers, microsatellites are the most popular. These are biparental nuclear repetitive segments (inherited from both mother and father), which are very useful in recent scale analysis (last decades and centuries), as in studies of paternity, kinship, inter-population gene flow and inbreeding estimates. In longer time scales (thousands to millions of years), the association of various markers representative of the entire genome allows one to generate more robust intra and interspecific phylogenetic trees that can clarify doubts in the systematics and natural history of some taxonomic groups (FRANKHAM et al., 2008). Therefore, with the growing availability of genomic data for several species, including the manatee (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/S2S3>), new nuclear markers based on sequencing or genotyping of point mutations (SNPs) can be developed and used to complement genetic data obtained with mtDNA and microsatellites.

populares são os microssatélites, segmentos repetitivos nucleares biparentais (herdados do pai e da mãe) que se mostram muito úteis nas análises em escalas recentes (últimas décadas e séculos), tal como nos estudos de paternidade, parentesco, fluxo gênico interpoblacional e estimativas de endogamia. Nas escalas temporais antigas (milhares a milhões de anos), a associação de vários marcadores representativos de todo o genoma permite gerar filogenias intra e interespecíficas mais robustas, que podem esclarecer dúvidas em sistemática e história natural de alguns grupos taxonômicos (FRANKHAM *et al.*, 2008). Portanto, com a disponibilização crescente de dados genômicos de vários organismos, inclusive do peixe-boi-marinho (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/68243>), novos marcadores nucleares baseados em sequenciamento ou genotipagem de mutações de ponto (SNPs) podem ser desenvolvidos e utilizados para complementar os dados genéticos obtidos com DNAm e microssatélites.

## Fundamentos genéticos para a prática da conservação

### Genetic fundamentals for conservation practice

No nível intraspecífico, a genética lida com toda a variação hereditária genotípica e fenotípica que é necessária para a continuidade evolutiva das populações ameaçadas. Quando esta variação é quantificada dentro de populações, ela permite entender aspectos relacionados à biologia reprodutiva (poligínia, poliandria, paternidade extra-par, nível de parentesco, etc) e à diversidade genética que ainda existe (FRANKHAM *et al.*, 2008). Normalmente, esta diversidade é quantificada com marcadores neutros (não influenciados pela Seleção Natural), mas com os novos dados genômicos e a identificação de genes relacionados a processos adaptativos ou reprodutivos, a quantificação da variação diretamente ligada à adaptação populacional poderá ser futuramente utilizada. Com este tipo de evidência genética intrapoblacional é possível, por exemplo, sugerir manejos para o aumento da diversidade genética e diminuição da homoziguidade (nos casos de endogamia) das populações naturais, ou nos casos de cativeiro, planejar acasalamentos que evitem, por exemplo, a endogamia e a manifestação de desordens recessivas (FRANKHAM *et al.*, 2008, Figura 1).

Outras análises estimam também a diversidade que existe entre populações, as quais podem ser mais ou menos diferenciadas, dependendo do grau de isolamento de cada uma delas, ou seja, o nível de fluxo gênico entre elas. Estes resultados permitem inferir o padrão de estruturação populacional, que na maior parte dos casos está relacionado com a distribuição geográfica das populações. Estas medidas de estruturação populacional permitem revelar agrupamentos de indivíduos ou populações muito divergentes que, em certos casos, podem ser consideradas subespécies ou *quasi*-espécies (espécies incipientes). Na prática da conservação, estas análises de estruturação populacional e filogeografia permitem identificar unidades evolutivas significativas (ESUs), que são populações

*At the intraspecific level, genetics deals with the entire genotypic and phenotypic hereditary variation that is required for the evolutionary continuity of threatened populations. When this variation is quantified within populations, it clarifies aspects related to reproductive biology (polygyny, polyandry, extra-pair paternity, level of kinship, etc.) and to remaining genetic diversity (FRANKHAM *et al.*, 2008). Normally, this diversity is quantified with neutral markers (not influenced by natural selection), but with new genomic data and the identification of genes related to adaptive or reproductive processes, the quantification of variation directly linked to the population adaptation may be used in the future. With this type of intra-population genetic evidence it is possible, for example, to suggest management measures to increase genetic diversity and decrease homozygosity (in cases of inbreeding) of natural populations, or, in captivity cases, to plan matings which avoid, for example, inbreeding and the manifestation of recessive disorders (FRANKHAM *et al.*, 2008, Figure 1).*

*Other analyses also estimate the diversity between populations, which can be more or less differentiated, depending on the degree of isolation of each one of them, i.e. the level of gene flow between them. These results allow us to infer the population-structuring pattern, which in most cases relates to the geographic distribution of the populations. These measures of population structuring reveal very divergent groupings of individuals or populations, which may, in certain cases, be considered subspecies or quasi-species (incipient species). In conservation practice, these analyses of population structuring and phylogeography allow the identification of Evolutionary Significant Units (ESUs), which are populations with relative evolutionary independence that are generally treated as different management units or populations of conservation priority. This enables the development of management methods aimed at perpetuating the evolutionary dynamics of natural populations, minimizing recent anthropic impacts and future problems evolving from inadequate management (FRANKHAM *et al.*, 2008).*

*The population structuring, especially in the long term (several thousands of years), should be seriously considered in cases of management involving the translocation of individuals between divergent populations. Although increasing genetic diversity*

com relativa independência evolutiva e são geralmente tratadas como unidades diferentes de manejo ou populações prioritárias para conservação. Isto permite a implantação de métodos de manejo que visem perpetuar a dinâmica evolutiva das populações naturais, minimizando impactos antrópicos recentes e futuros problemas advindos do manejo inadequado (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A estruturação populacional, principalmente aquela de longo prazo (vários milhares de anos), deve ser seriamente considerada nos casos de manejo envolvendo a translocação de indivíduos entre populações divergentes. Embora o aumento da diversidade genética seja um dos objetivos do manejo na natureza e um critério importante para reverter efeitos negativos da endogamia, o cruzamento entre indivíduos de populações que possuem grandes diferenças genéticas, seja por adaptações exclusivas para cada localidade ou por combinações adaptadas de genes (epistasia), pode resultar na menor viabilidade ou problemas reprodutivos na prole (FRANKHAM *et al.*, 2008). Este efeito deletério é conhecido como depressão exogâmica, uma diminuição do valor adaptativo populacional devido à inviabilidade relativa da prole destes cruzamentos que pode levar à extinção local de populações com número reduzido (Figura 1). Isto se dá porque os indivíduos oriundos destes cruzamentos não são tão adaptados para a sobrevivência quanto os seus pais, nos seus respectivos ambientes originais (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Os efeitos da depressão exogâmica são ainda mais drásticos quando há hibridização entre espécies diferentes, podendo ocorrer uma acentuada diminuição da viabilidade populacional (ALLENDORF *et al.*, 2001). Em raros casos, alguns híbridos são férteis e podem cruzar com uma das espécies parentais, resultando em introgressão. Estes híbridos podem competir por recursos e prioridade reprodutiva, diminuindo o valor adaptativo das populações locais das espécies parentais e, eventualmente, levar à extinção local ou global. A depressão exogâmica intra e interespecífica (Figura 1) aparece, normalmente, por consequência de dois tipos de efeitos antropogênicos: indiretos, quando o declínio populacional resulta em aumento da hibridização (principalmente entre espécies); ou diretos, quando o manejo inadequado das translocações põe em contato indivíduos de populações ou espécies muito divergentes geneticamente.

*is one of the management objectives in nature and an important criterion to revert the negative effects of inbreeding, the mating between individuals from genetically different populations, because of either adaptations unique to each locality or adapted combinations of genes (epistasis), may result in lower viability or reproductive problems in the offspring (FRANKHAM *et al.*, 2008). This deleterious effect is known as outbreeding depression, a decrease in the population adaptive value due to the relative unviability of the offspring from these matings that can lead to the local extinction of small populations (Figure 1). This is because the individuals born from these matings are not as adapted as their parents for the survival in their respective original environments (FRANKHAM *et al.*, 2008).*

*The effects of outbreeding depression are even more drastic when there is hybridization between different species, possibly leading to a marked reduction of the population viability (ALLENDORF *et al.*, 2001). In rare cases, some hybrids are fertile and can mate with one of the parental species, resulting in introgression. These hybrids can compete for resources and reproductive priority, decreasing the adaptive value of local populations of the parental species and possibly lead to local or global extinction. The intra and interspecific outbreeding depression (Figure 1) appears, normally, as a result of two types of anthropogenic effects: indirect, when the population decline results in increased hybridization (mainly between species); or direct, when the inadequate management of translocations brings into contact individuals from genetically divergent populations or species.*

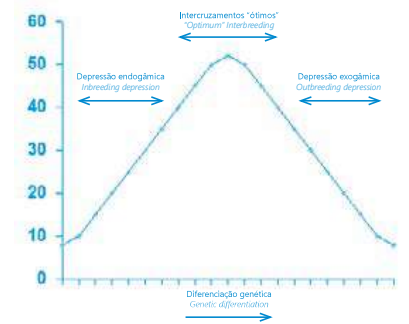


Figura 1. Gráfico que mostra a associação entre viabilidade e/ou sucesso reprodutivo da prole e a diferenciação genética entre os pais. A parte interna da curva revela a "zona ótima" de intercruzamentos e nas extremidades aparecem as zonas com efeitos negativos (depressão) dos intercruzamentos extremos endogâmicos e exogâmicos.



## Estudos genéticos com peixes-bois

### Genetic studies with manatees

Os primeiros estudos de citogenética indicaram composições cromossômicas diferentes entre a espécie marinha (*Trichechus manatus*) e a espécie amazônica (*T. inunguis*) (ASSIS et al., 1988; GRAY et al., 2002; WHITE et al., 1976). O peixe-boi-marinho apresenta número diploide (2n) de 48 cromossomos, com cariótipo constituído principalmente por cromossomos de dois braços (metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos), enquanto que o peixe-boi-amazônico possui 56 cromossomos, sendo encontrados vários pares cromossômicos acrocêntricos (um braço). A espécie do ocidente africano (*T. senegalensis*) não tem dados cariotípicos e o dugongo (*Dugong dugon*), siriêno do oriente africano, sul da Ásia e Oceania, possui 50 cromossomos (SHORT, 1984).

Recentemente, uma análise citogenética comparativa (BARROS, 2014) entre *T. manatus* e *T. inunguis* com a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e sondas teloméricas revelou sinais de hibridização apenas nas regiões teloméricas, mas não foram observados remanescentes de telômeros intersticiais nos seus cromossomos, os quais seriam indicativos de inversões e fusões cromossômicas durante a diferenciação cariotípica. Este resultado está de acordo com a proposta de Gray et al. (2002), que indica que a evolução das diferenças cariotípicas observadas entre estas duas espécies poderia ser melhor explicada pela ocorrência de uma variedade de mecanismos de rearranjos intra e intercromossômicos e não somente por rearranjos do tipo fusão ou fissão cromossômica, como sugerido por Assis et al. (1988). Análises cariotípicas detalhadas (BARROS, 2014) também revelaram algumas diferenças no nível intraespecífico entre a população de *T. manatus* do Brasil e as populações de *T. manatus* que habitam Porto Rico e Flórida (EUA). Os pares cromossômicos 4 e 10 se mostraram metacêntrico e submetacêntrico, respectivamente, na população brasileira, enquanto nas populações do Caribe e da Flórida, estes pares são submetacêntrico e subtelocêntrico, respectivamente (GRAY et al., 2002; HUNTER et al., 2012). Assim, embora os peixes-bois que ocorrem em Porto Rico sejam tradicionalmente classificados como parte da subspecie *Trichechus manatus manatus*, estes apresentaram um cariótipo similar ao observado em *T. m. latirostris* (HUNTER et al., 2012) e diferente da população brasileira que também é classificada como *T. m. manatus*.

O primeiro estudo de variação molecular com o peixe-boi-marinho (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 1998) identificou baixa diversidade nos dois extremos da distribuição da espécie, nas populações da Flórida (EUA) e do Brasil, assim como algumas descontinuidades na distribuição, que influenciam o padrão de fluxo gênico interpopulacional. Este estudo inicial também mostrou a existência de três haplogrupos ou linhagens mitocondriais (Figura 2) que não eram coerentes com a divisão de subspecies sugerida por análises morfológicas com um número limitado de amostras (DOMNING; HAYEK, 1986). Essas primeiras evidências genéticas foram corroboradas por um estudo posterior com marcadores mitocondriais e nucleares em uma grande amostragem (VIANNA et al., 2006a,b), de 189 indivíduos de *T. manatus*, 93 de *T. inunguis* e seis de *T. senegalensis*. Este primeiro estudo de genética comparada entre as três espécies de peixe-boi

The first cytogenetic studies indicated different chromosomal compositions between the marine species (*Trichechus manatus*) and the Amazonian species (*T. Inunguis*) (ASSIS et al., 1988; GRAY et al., 2002; WHITE et al., 1976). The West Indian manatee has a diploid number (2n) of 48 chromosomes, with a karyotype consisting primarily of chromosomes with two arms (metacentric, submetacentric and subtelocentric), while the Amazonian manatee has 56 chromosomes and several pairs of acrocentric (one arm) chromosomes can be found. The African species (*T. senegalensis*) has no karyotypic data and the Dugong (*Dugong dugon*), the East African, South Asian and Oceania sirenian, has 50 chromosomes (SHORT, 1984).

Recently, a comparative cytogenetic analysis (BARROS, 2014) between *T. manatus* and *T. inunguis*, with the technique of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and telomeric probes, showed signs of hybridization in the telomeric regions only, but no interstitial telomere remnants were observed in their chromosomes, which would be indicative of chromosomal inversions and fusions during the karyotypic differentiation. This result is in agreement with Gray et al. (2002), which proposed that the evolution of the karyotype differences observed between these two species could be better explained by the occurrence of a variety of intra and inter-chromosomal rearrangement mechanisms and not only by chromosomal fusion or fusion-type rearrangements, as suggested by Assis et al. (1988). Detailed karyotypic analyses (BARROS, 2014) also revealed some differences at the intraspecific level between the population of *T. manatus* from Brazil and the populations of *T. manatus* that inhabit Puerto Rico and Florida (USA). The chromosomal pairs 4 and 10 are metacentric and submetacentric, respectively, in the Brazilian population, while in the populations from the Caribbean and Florida these pairs are submetacentric and subtelocentric, respectively (GRAY et al., 2002; Hunter et al., 2012). Thus, while the manatees that occur in Puerto Rico are traditionally classified as part of the *Trichechus manatus manatus* subspecies, these presented a karyotype similar to that observed in *T. m. latirostris* (HUNTER et al., 2012) and different from the Brazilian population that is also classified as *T. m. manatus*.

The first molecular variance study with the West Indian manatee (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 1998) identified low diversity at the two extremes of the species distribution, in populations of Florida (USA) and Brazil, as well as some discontinuities in the distribution, which influence the pattern of interpopulation gene flow. This initial study also showed the existence of three haplogroups, or mitochondrial lineages (Figure 2), that were not consistent with the subspecies division suggested by morphological analysis with a limited number of samples (DOMNING; HAYEK, 1986). These first genetic evidences were corroborated by a later study with nuclear and mitochondrial markers in a large sample size (VIANNA et al., 2006a,b) of 189 individuals of *T. manatus*, 93 of *T. inunguis* and six of *T. senegalensis*. This first comparative genetics study between the three species of manatees showed different evolutionary dynamics between them, as can be seen in the compared phylogeography study between the American species (Figure 2). The African manatee (*T. senegalensis*) presented divergent lineages associated with different river basins in west Africa, while the Amazonian manatee (*T. inunguis*) configured as a species of more recent origin than *T. manatus* (Figure 2), whose population began to expand a little more than 100 thousand years ago, probably from ancestors with unique adaptations to the Amazon river environment.

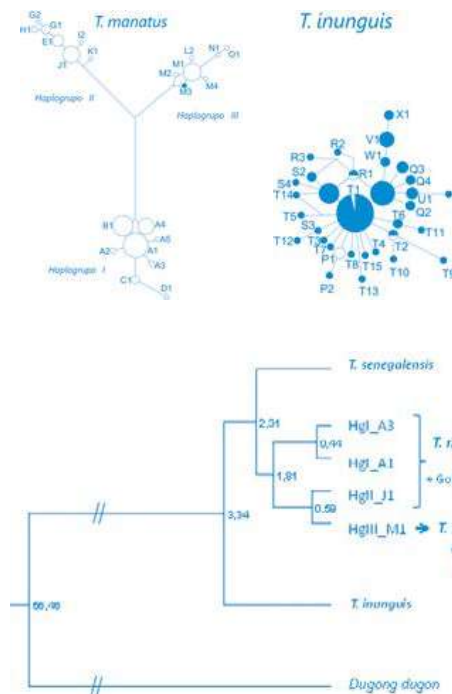


Figura 2. Filogeografia comparada das espécies americanas de peixe-boi com dados da região controle do DNAmT (VIANNA et al., 2006a). Cada círculo representa uma sequência nucleotídica diferente de DNAmT, chamada de haplótipo, cuja área é proporcional ao número de indivíduos. O comprimento das linhas (ramos) é proporcional às diferenças nucleotídicas (mutações) entre os haplótipos. A cor dos círculos indica origem materna do DNAmT branca (*T. manatus*) e azul (*T. inunguis*). Os haplótipos M3, R1, T1, T2 e P1 representam alguns indivíduos híbridos encontrados neste estudo e o haplótipo M4 foi descrito recentemente na população do Brasil (LUNA et al., 2012). Para a espécie *T. manatus* foram detectados três agrupamentos (haplogrupos I, II e III) de haplótipos que são filogeneticamente muito divergentes entre si.

Figure 2. Compared phylogeography of the American manatee species with data from the mtDNA control region (VIANNA et al., 2006a). Each circle represents a different mtDNA nucleotide sequence, called haplotype, the area of which is proportional to the number of individuals. The length of the lines (branches) is proportional to the nucleotide differences (mutations) among the haplotypes. The color of the circles indicates maternal origin of the mtDNA white (*T. manatus*) and blue (*T. inunguis*). The haplotypes M3, R1, T1, T2 and P1 represent some hybrid individuals found in this study and the haplotype M4 was recently described in the population from Brazil (LUNA et al., 2012). For the species *T. manatus* three groups were detected (Haplogroups I, II and III) of haplotypes that are phylogenetically very divergent.

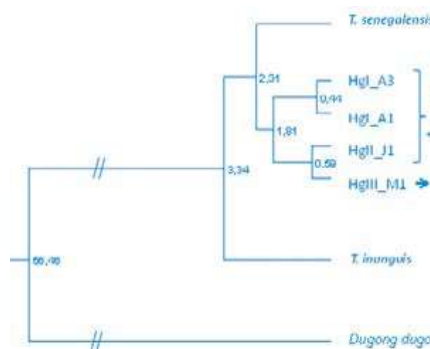


Figura 3. Filogenia bayesiana das linhagens e espécies de peixes-bois utilizando datações calibradas por fósseis (software Beast v2.2; BOUCKAERT et al., 2014) a partir de dados de Cytocromo B (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 1998; VIANNA et al., 2006a). Os fósseis de siriênios utilizados definem datas para a divergência entre *Trichechus* e *Dugong* entre 47,6 e 66 milhões de anos (DOMNING et al., 2010). Foi utilizado relógio molecular estrito ou relaxado e diferentes grupos externos compostos por *Dugong* ou por outros Afrotheria como elefantes e hiras. Todas as filogenias apresentaram topologia e datações muito similares. As datas das separações dos ramos se referem a milhões de anos (MA). Hgl, HglI e HglII se referem aos haplogrupos de *T. manatus* previamente identificados (Figura 2).

Figure 3. Bayesian phylogeny of manatee lineages and species using dating calibrated by fossils (Beast software v2.2; BOUCKAERT et al., 2014) from cytochrome b data (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 1998; VIANNA et al., 2006a). The sirenian fossils used define dates for the divergence between *Trichechus* and *Dugong* between 47.6 and 66 million years (DOMNING et al., 2010). Relaxed or strict molecular clocks and different external groups composed by *Dugong* or by other Afrotheria, such as elephants and hiras, were used. All phylogenetic trees presented very similar topologies and datings. The branch separation dates refer to millions of years (MA). Hgl, HglI and HglII relate to the previously identified *T. manatus* haplogroups (Figure 2).

demonstrou diferentes dinâmicas evolutivas entre elas, como pode ser visto no estudo de filogeografia comparada entre as espécies americanas (Figura 2). O peixe-boi-africano (*T. senegalensis*) apresentou linhagens divergentes associadas a diferentes bacias fluviais no oeste da África, enquanto o peixe-boi-amazônico (*T. inunguis*) se configurou como uma espécie de origem mais recente que *T. manatus* (Figura 2), cuja população começou a se expandir há pouco mais de 100 mil anos, provavelmente a partir de ancestrais com adaptações únicas para o ambiente fluvial amazônico.

Foram feitos estudos com uma grande amostragem do peixe-boi-marinho (*T. manatus*) ao longo de sua distribuição nos litorais americanos do Caribe, Golfo do México e do Atlântico, da Flórida (EUA) ao nordeste do Brasil (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 1998; VIANNA *et al.*, 2006a). A espécie marinha apresentou uma separação significativa entre populações e áreas geográficas (Figura 2), representadas por uma ESU (unidade evolutiva significativa) com haplogrupos I e II e que habita as costas do Caribe e Golfo do México, da Colômbia à Flórida (EUA) e Antilhas, e outra ESU com indivíduos do haplogrupo III e que habita o nordeste do Atlântico da América do Sul, das Guianas ao Brasil (VIANNA *et al.*, 2006a,b; PARR *et al.*, 2012). As primeiras análises filogenéticas com métodos de datação baseados em "árvores linearizadas" implementadas no programa Mega v3 (KUMAR *et al.*, 2004) indicavam uma separação de pelo menos 130 mil anos (VIANNA *et al.*, 2006a) entre as duas unidades evolutivas significativas (ESUs), as populações do Atlântico (Guianas e Brasil) e do Caribe+Golfo do México. As duas ESUs surgiram, aparentemente, por processos vicariantes ocorridos durante as glaciações do Pleistoceno, quando o nível do mar estava até 120 m abaixo do nível atual e as Antilhas formaram uma barreira (Arco das Antilhas), tornando o mar do Caribe (e Golfo do México) relativamente isolado do nordeste Atlântico (PELTIER, FAIRBANKS, 2006). Estes eventos de vicariância marinha são a provável causa da grande diferenciação genética das linhagens mitocondriais (haplogrupos I, II e III) e do longo tempo de separação entre as populações do Atlântico e aquelas do Caribe e Golfo do México, que é estimada em 590 mil anos, data obtida com filogenia bayesiana de DNAmT e calibração cronológica com fósseis de sirênios (Figura 3).

Os primeiros estudos genéticos com populações de peixe-boi-amazônico foram publicados por dois grupos independentes com amostragens diferentes (CANTANHEDE *et al.*, 2005; VIANNA *et al.*, 2006a). Os resultados das análises filogeográficas e de genética populacional de ambos os estudos indicaram que esta espécie possui uma grande diversidade genética remanescente, mas que apresenta um agrupamento compacto de linhagens genéticas relacionadas (Figura 2). Isto indicou uma origem mais recente para esta espécie, que apresentou uma expansão populacional nos últimos 120 mil anos (VIANNA *et al.*, 2006a), podendo estar relacionada ao aparecimento recente de novas adaptações para sobrevivência no ambiente amazônico, permitindo a esta espécie colonizar vários afluentes com diferentes características. O peixe-boi-amazônico não apresentou uma diferenciação e estruturação geográfica tão grande quanto o peixe-boi-marinho, mas esta divergência interpopulacional variou de 10 a 22 % (Fst), dependendo de qual tipo de agrupamento geográfico era utilizado (VIANNA *et al.*, 2006a).

Vários outros estudos genéticos foram feitos recentemente com *T. manatus*, utilizando marcadores baseados em microsatélites e DNAmT. Tucker *et al.* (2012) utilizaram 18 microsatélites e compararam indivíduos de quatro unidades de

*Studies were conducted with a large sample size of the West Indian manatee (T. manatus) along their distribution in the American coasts of the Caribbean, Gulf of Mexico and the Atlantic, from Florida (USA) to northeastern Brazil (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 1998; VIANNA et al., 2006a). The marine species presented a significant separation between populations and geographical areas (Figure 2), represented by an Evolutionarily Significant Unit (ESU) with haplogroups I and II, which inhabit the coast of the Caribbean and Gulf of Mexico, from Colombia to Florida (USA) and the Antilles, and another ESU with individuals from haplogroup III, that live in the Northeast Atlantic of South America, from Guyana to Brazil (VIANNA et al., 2006a,b; PARR et al., 2012). The first phylogenetic analyses with dating methods based on "linearized" trees implemented in the program Mega v3 (KUMAR et al., 2004) indicated a separation of at least 130 thousand years (VIANNA et al., 2006a) between the two ESUs, the populations of the Atlantic (Guyanas and Brazil) and the Caribbean + Gulf of Mexico. The two ESUs arose, apparently, by vicariant processes occurring during the Pleistocene glaciers, when the sea level was up to 120 m below the current level and the Antilles formed a barrier (Antilles Arc), making the Caribbean Sea (and Gulf of Mexico) relatively isolated from the North East Atlantic (PELTIER, FAIRBANKS, 2006). These vicariant marine events are the likely cause of the great genetic differentiation between the mitochondrial lineages (haplogroups I, II and III) and the long period of separation between the populations of the Atlantic and the Caribbean and Gulf of Mexico, which is estimated at 590 thousand years, obtained with mtDNA Bayesian phylogeny and chronological calibration with sirenian fossils (Figure 3).*

*The first genetic studies with populations of the Amazonian manatee were published by two independent groups with different samplings (CANTANHEDE et al., 2005; VIANNA et al., 2006a). The results of the phylogeographic and population genetics analyses from both studies indicated that this species has a large remaining genetic diversity, but that it has a compact grouping of related genetic lineages (Figure 2). This indicated a more recent origin for this species, which underwent a population expansion in the last 120 thousand years (VIANNA et al., 2006a), and may be related to the recent emergence of new adaptations for survival in the Amazonian environment, allowing this species to colonize several tributaries with different characteristics. The Amazonian manatee did not show a differentiation and geographic structuring as large as the West Indian manatee, but this inter-population divergence ranged from 10 to 22 % (Fst), depending on which type of geographic grouping was used (VIANNA et al., 2006a).*

*Several other genetic studies were recently performed with T. manatus, using markers based on microsatellites and mtDNA. Tucker et al. (2012) used 18 microsatellites and compared individuals from four management units in Florida (USA), from the east coast and the Gulf. The data obtained showed low genetic diversity in manatees from Florida and little differentiation between them. Hunter et al. (2010) used microsatellites and mtDNA sequences and demonstrated the low genetic diversity in the population of Belize, with significant differentiation between groups located in City Cayes and Southern Lagoon, which are different habitats. With the same markers, Hunter et al. (2012) showed significant differences between the populations of Florida (USA) and Puerto Rico, suggesting that there has been no recent mixing (past few centuries) between the two locations.*

*Nourisson et al. (2011) used mtDNA and microsatellites to study the distribution of the populations that inhabit the coastal systems and wetlands of the Gulf of Mexico and the Caribbean coast. The data revealed a differentiated grouping in the Gulf of Mexico and another in the Bay of Chetumal (Caribbean), with a mixing zone between them in the Bay of Ascension. A gene flow was also identified in the direction from the Gulf of Mexico to the Caribbean coast, and it was demonstrated that several mtDNA haplotypes found in the Caribbean are also present in the Gulf of Mexico, in Florida (USA) and in Belize. The data from Nourisson et al. (2011) clearly show the connection between these Caribbean populations, the Gulf of Mexico and Florida, emphasizing the importance of maintaining this natural migration route, ensuring a greater genetic diversity and the evolutionary dynamics of these populations.*

manejo da Flórida (EUA), das costas leste dos EUA e do Golfo. Os dados obtidos demonstraram baixa diversidade genética nos peixes-bois-marinhos da Flórida e pouca diferenciação entre elas. Hunter *et al.* (2010) utilizaram microsatélites e sequências de DNAmT e demonstraram a baixa diversidade genética na população de Belize, com diferenciação significativa entre grupos localizados em City Cayes e Southern Lagoon, que são habitats diferentes. Com os mesmos marcadores, Hunter *et al.* (2012) mostraram diferenças significativas entre as populações da Flórida (EUA) e de Porto Rico, sugerindo que não há mistura recente (últimos séculos) entre as duas localidades.

Nourisson *et al.* (2011) utilizaram DNAmT e microsatélites para estudar a distribuição das populações do México que habitam os sistemas costeiros e zonas úmidas do Golfo do México e da costa do Caribe. Os dados revelaram um agrupamento diferenciado no Golfo do México e outro na Baía de Quetumal (Caribe), com uma zona de mistura entre elas na Baía de Ascención. Foi também identificado um fluxo gênico no sentido do Golfo do México para a costa do Caribe, e demonstrado que vários haplótipos de DNAmT encontrados no Caribe estão também presentes no Golfo do México, na Flórida (EUA) e em Belize. Estes dados de Nourisson *et al.* (2011) demonstram claramente a conexão destas populações do Caribe, do Golfo do México e Flórida, ressaltando a importância de se manter esta rota natural de migração, garantindo uma maior diversidade genética e a dinâmica evolutiva destas populações.

Estudos genéticos com os peixes-bois-marinhos e amazônicos nos rios da Colômbia (SATIZÁBAL *et al.*, 2012) também revelaram estruturas populacionais significativas e uma tendência de dispersão sexo-específica restrita a machos. Os dados de DNAmT e de microsatélites indicaram a existência de duas populações diferenciadas de peixe-boi-amazônico, separando a Amazônia colombiana e peruana. Já o peixe-boi-marinho apresentou diferenciação populacional significativa entre os rios colombianos com o DNAmT, mas não com os dados de microsatélites, indicando fluxo gênico promovido por machos, provavelmente através de migração pelo litoral.

No Brasil, as populações de peixe-boi-marinho da costa nordeste (Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Maranhão) foram analisadas com DNAmT (LUNA *et al.*, 2012) e foi encontrado um novo haplótipo (M04) em dois indivíduos do Maranhão e um do Piauí, além dos haplótipos previamente descritos (VIANNA *et al.*, 2006a). Luna *et al.* (2012) sugeriram que por terem um haplótipo diferente de DNAmT, indivíduos capturados ou encalhados nesta área não poderiam ser liberados em outros lugares como Alagoas, por exemplo. No entanto, os autores não apresentaram a análise filogenética. Uma reanálise dos dados realizada pelos autores deste capítulo (Figura 2) demonstra que M04 se diferencia do principal haplótipo encontrado na população brasileira (M01) por apenas uma mutação, que pode acontecer espontaneamente em uma geração. Então, consideramos que o argumento de possível depressão exogâmica levantado por Luna *et al.* (2012) para não liberação em áreas diferentes, não procede.

*Genetic studies with West Indian and Amazonian manatees in the rivers of Colombia (SATIZÁBAL et al., 2012) also revealed significant population structures and a sex-specific dispersion tendency restricted to males. The mtDNA and microsatellite data indicated the existence of two differentiated Amazonian manatee populations, separating the Colombian Amazon and Peru. The West Indian manatee, on the other hand, presented significant population differentiation between the Colombian rivers with mtDNA, but not with the microsatellite data, indicating gene flow promoted by males, probably through coastal migration.*

*In Brazil, the manatee populations from the northeast coast (Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí and Maranhão) were analyzed with mtDNA (LUNA et al., 2012) and a new haplotype (M04) was found in two individuals from Maranhão and Piauí, in addition to the previously described haplotypes (VIANNA et al., 2006a). Luna et al. (2012) suggested that because this was a different mtDNA haplotype, individuals captured or stranded in this area should not be released in other places such as Alagoas, for example. However, the authors did not present the phylogenetic analysis. A review of the data held by the authors of this chapter (Figure 2) shows that M04 differentiates from the main haplotype found in the Brazilian population (M01) by only one mutation, which can occur spontaneously in one generation. Thus, we believe that the argument of possible outbreeding depression raised by Luna et al. (2012) not to release in different areas, is unfounded.*

## Hibridização interespecífica entre Sirênios da América do Sul

### *Interspecific hybridization amongst South American Sirenians*

A formação de híbridos entre as espécies de peixe-boi-amazônico e marinho foi demonstrada pela análise de diferentes marcadores mitocondriais, nucleares e dados citogenéticos por Vianna *et al.* (2006a,b) e Parr *et al.* (2012). Foram identificados sete indivíduos híbridos entre *T. manatus* e *T. inunguis* na zona costeira do Atlântico norte da América do Sul, sendo três na Guiana Francesa, três na Guiana e um no estado brasileiro do Amapá. Estes híbridos costeiros foram reconhecidos morfológicamente como peixe-boi-marinho, mas possuíam DNAmT de *T. inunguis*, indicando uma origem materna da espécie amazônica. Também foi identificado um híbrido no Rio Amazonas, próximo a Belém (Pará, Brasil), identificado inicialmente como peixe-boi-amazônico, mas com DNAmT de peixe-boi-marinho. Um híbrido macho que se encontra em cativeiro e de nome Poque, oriundo da região costeira do Amapá (próximo ao Rio Oiapoque), foi estudado também por citogenética e apresentou 50 cromossomos, um número intermediário entre a espécie marinha (2n=48) e a espécie amazônica (2n=56) (VIANNA *et al.*, 2006a; PARR *et al.*, 2012). Esta configuração cromossômica e a composição de alelos de microssatélites indicam que este indivíduo deve ser um híbrido de segunda geração (F2), filho de um pai da espécie marinha com uma mãe híbrida F1 (que teria provavelmente 52 cromossomos e DNAmT da espécie amazônica).

As evidências genéticas identificaram uma zona de hibridização ao redor da foz do Rio Amazonas (Figura 4), com ocorrência de híbridos principalmente no litoral oeste da foz, na região das Guianas (incluindo o Amapá), que perfazem mais de 40% da população analisada (VIANNA *et al.*, 2006a e dados não publicados).

The hybridization between Amazonian and West Indian manatees was demonstrated by analysis of different mitochondrial and nuclear markers and cytogenetic data by Vianna *et al.* (2006a,b) and Parr *et al.* (2012). Seven hybrid individuals were identified between *T. manatus* and *T. inunguis* in the coastal zone of the north Atlantic of South America, three in French Guiana, three in Guyana and one in the Brazilian state of Amapá. These hybrids were recognized morphologically as West Indian manatees but had *T. inunguis* mtDNA, indicating that the maternal lineage came from the Amazonian manatee. A hybrid was also found in the Amazon river, close to Belém (Pará, Brazil), initially identified as Amazonian manatee, but with West Indian mtDNA. A hybrid male called Poque, which is in captivity and came from the coastal region of Amapá (near the Oiapoque River) was also studied by cytogenetics and presented 50 chromosomes, an intermediary number between the marine species (2n=48) and the Amazonian species (2n=56) (VIANNA *et al.*, 2006a; PARR *et al.*, 2012). This chromosomal configuration and microsatellite allele composition indicates this individual is probably a second-generation (F2) hybrid, the son of a West Indian father with an F1 hybrid mother (which would probably have 52 chromosomes and Amazonian mtDNA).

Genetic evidence identified a hybridization zone around the mouth of the Amazon River (Figure 4), with the occurrence of hybrids mainly on the west coast of the estuary, in the Guyana region (including Amapá), which make up more than 40% of the studied population (VIANNA *et al.*, 2006a and unpublished data).

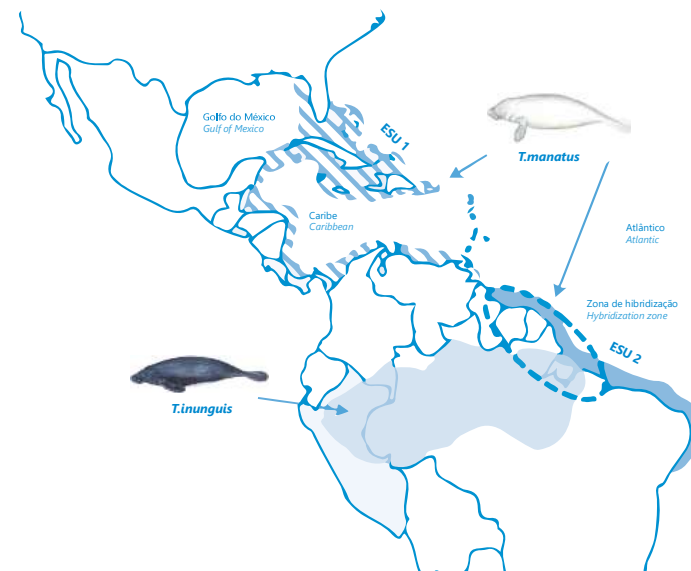


Figura 4. Distribuição das espécies americanas de peixe-boi e a zona de hibridização interespecífica (elipse azul). Também são apresentadas as áreas de distribuição das duas unidades evolutivas significativas de *Trichechus manatus*: ESU-1 (Caribe e Golfo do México: Venezuela aos EUA e Antilhas) e ESU-2 (Atlântico: Brasil e Guianas).  
 Figure 4. American manatee species distribution and interspecific hybridization zone (blue ellipse). The distribution areas of the two evolutionary significant units of *Trichechus manatus* are also shown: ESU-1 (Caribbean and Gulf of Mexico: Venezuela to the USA and the Antilles) and ESU-2 (Atlantic: Brazil and Guianas).

## Implicações dos dados genéticos para a conservação dos peixes-bois

### Implications of genetic data for manatee conservation

O único estudo genético feito com a espécie de peixe-boi-africano (VIANNA *et al.*, 2006a) indica que há estruturação populacional de acordo com as bacias fluviais da África ocidental. No entanto, esta espécie carece urgentemente de estudos genéticos e ecológicos, sendo a menos conhecida e está atualmente muito ameaçada, não apenas pela caça, mas também pela construção de várias barragens nos rios do oeste da África, que estão isolando artificialmente as populações que antes eram conectadas.

Embora as populações de peixe-boi-amazônico não tenham apresentado uma estruturação populacional marcada como visto para a espécie marinha, a diferenciação interpopulacional moderada ( $F_{ST} \sim 0.20$ ) indica que pode haver populações amazônicas com um relativo isolamento das demais (VIANNA *et al.*, 2006a; SATIZÁBAL *et al.*, 2012). No entanto, ainda falta um estudo detalhado das populações de várias sub-bacias para desvendar a estrutura e dinâmica evolutiva populacional desta espécie, com finalidade de sugerir translocação de indivíduos entre as diversas áreas na Amazônia. Com os dados existentes, o ideal é manter os eventos de translocação de indivíduos, caso se façam necessários, restritos a uma mesma sub-bacia (SATIZÁBAL *et al.*, 2012).

O peixe-boi-marinho é a espécie de sirênio mais estudada cientificamente, principalmente a população da Flórida, nos Estados Unidos. Também é a espécie com mais dados genéticos gerados a partir de uma amostragem representativa de quase toda a sua distribuição atual. Por isto, *T. manatus* é a espécie de sirênio com mais evidências genéticas que já podem ser utilizadas na prática da conservação e elaboração de estratégias de manejo *ex-situ* e *in-situ*. Como evidenciado em vários estudos genéticos com DNAmT e microsátelites, muitas populações têm baixa diversidade e são endogâmicas, por exemplo, as populações do extremo da distribuição, na Flórida (EUA) e Brasil. A liberação de indivíduos nestas áreas pode ser promovida com a intenção de aumentar a diversidade genética local ou até mesmo recolonizar uma área onde houve extinção local da espécie. Para isto, temos de utilizar evidências da dinâmica evolutiva nesta espécie, tal como a identificação de duas ESUs (Figura 4), os dois grupos populacionais que foram separados por tempo suficiente para o acúmulo de diferenças adaptativas. Estas diferenças moleculares entre as ESUs são corroboradas por análises citogenéticas e análises de morfometria geométrica dos crânios (BARROS, 2014) demonstrando que a população brasileira de *T. manatus* possui características diferentes das populações do Caribe e da Flórida (EUA). Portanto, as evidências moleculares, citogenéticas e morfológicas (VIANNA *et al.*, 2006a,b; NOURISSON *et al.*, 2011; PARR *et al.*, 2012; BARROS, 2014) não estão de acordo com a classificação subspecífica reconhecida para *T. manatus* (DOMNING e HAYEK 1986), sugerindo que deve ser feita uma revisão taxonômica neste taxon.

No manejo de *T. manatus*, os processos de translocação e reintrodução de peixes-bois devem considerar as duas ESUs como unidades totalmente independentes de manejo, isto é, as liberações de indivíduos ao ambiente natural não devem ocorrer entre diferentes ESUs, separadas há vários milhares de anos (Figura 3). Outras considerações podem ser feitas no nível microgeográfico para tentar manter o padrão de fluxo gênico de curto prazo, isto é, a preferência de

The only genetic study carried out with the African manatee (VIANNA *et al.*, 2006a) indicates population structuring according to the West African river basins. However, this species is in urgent need of genetic and ecological studies, being the lesser known manatee species and currently highly threatened not only by poaching, but also by the construction of several dams in the rivers of West Africa that are artificially isolating the populations that were previously connected.

Although the Amazonian manatee populations have not exhibited a marked population structuring as seen in the marine species, the moderate inter-population differentiation ( $F_{ST} \sim 0.20$ ) indicates there may be some Amazonian populations relatively isolated from others (VIANNA *et al.*, 2006a; SATIZÁBAL *et al.*, 2012). However, we still lack a detailed study of the populations from several sub-basins to unveil the structure and evolutionary dynamics of this species, with the purpose of suggesting the translocation of individuals among the various areas in the Amazon. With the existing data, the ideal is to maintain the translocation of individuals, whenever required, restricted to a same sub-basin (SATIZÁBAL *et al.*, 2012).

The West Indian manatee is the most scientifically studied sirenian species, mainly the population from Florida in the United States. It is also the species with most genetic data generated from a representative sample of almost all its current distribution. For this reason, *T. manatus* is the sirenian species with most genetic evidence that can already be used in conservation practice and preparation of *ex-situ* and *in-situ* management strategies. As evidenced in several genetic studies with mtDNA and microsattellites, many populations have low diversity and are endogamous, for example, the populations of the extreme of the distribution, in Florida (USA) and Brazil. The release of individuals in these areas can be promoted with the intention of increasing the local genetic diversity or even recolonizing an area where the species was locally extinct. For this, evidence of evolutionary dynamics in this species must be taken into account, such as the identification of two ESUs (Figure 4), the two population groups that were separated long enough for the accumulation of adaptive differences. These molecular differences between the ESUs are corroborated by cytogenetic examination and analyses of skull geometric morphometrics (BARROS, 2014), demonstrating that the Brazilian *T. manatus* population has different characteristics from the populations in the Caribbean and Florida (USA). Therefore, the molecular, cytogenetic and morphological evidence (VIANNA *et al.*, 2006a,b; NOURISSON *et al.*, 2011; PARR *et al.*, 2012; BARROS, 2014) are not in accordance with the sub-specific classification recognized for *T. manatus* (DOMNING and HAYEK, 1986), suggesting the need for a taxonomic revision of this taxon.

In *T. manatus* management, the processes of translocation and reintroduction should consider the two ESUs as fully independent management units, i.e. the release of individuals to the natural environment should not occur between different ESUs, which have been separated for several thousand years (Figure 3). Other considerations can be made at the microgeographic level to attempt the maintenance of the short term gene flow pattern, that is, the preference for philopatric mating of manatee populations as previously identified by some studies (HUNTER *et al.*, 2010, 2012; NOURISSON *et al.*, 2011; TUCKER *et al.*, 2012; SATIZÁBAL *et al.*, 2012). However, this type of management is only advisable if the populations are relatively large or growing, and the increase of local genetic diversity or the recolonization of areas are not priority goals. In the Brazilian population of *T. manatus*, even if there are genetic differences and some geographic structure along the coast, all individuals belong to the same ESU (Atlantic) and breeding between any individuals of this ESU, including the Guyanas, should

acasalamento filopátrico das populações de peixe-boi-marinho como previamente identificado por alguns estudos (HUNTER *et al.*, 2010, 2012; NOURISSON *et al.*, 2011; TUCKER *et al.*, 2012; SATIZÁBAL *et al.*, 2012). No entanto, este tipo de manejo só é aconselhável se as populações forem relativamente grandes ou em expansão, e o aumento da diversidade genética local ou recolonização de áreas não forem metas prioritárias. Na população brasileira de *T. manatus*, mesmo que existam diferenças genéticas e alguma estruturação geográfica ao longo do litoral, todos os indivíduos pertencem à mesma ESU (Atlântica) e cruzamentos entre quaisquer indivíduos desta ESU, inclusive das Guianas, não devem resultar em depressão exogâmica, exceto se houver híbridos interespecíficos envolvidos (ver abaixo). Portanto, como foi demonstrada uma baixa diversidade genética na população brasileira (VIANNA *et al.*, 2006a; LUNA *et al.*, 2012), a translocação de indivíduos entre áreas diferentes do litoral brasileiro pode ser uma estratégia viável para diminuir a perda de diversidade por deriva e o aumento da endogamia local.

Entretanto, outra grande preocupação de conservação apareceu na América do Sul com a detecção de hibridização interespecífica entre os peixes-bois-marinhos e amazônico (VIANNA *et al.*, 2006a). Sabe-se que o processo de hibridização interespecífica ocorre naturalmente na evolução de vários grupos taxonômicos (ALLENDORF *et al.*, 2001), porém este fenômeno pode ser disparado por ações antropogênicas que promovem o declínio populacional das espécies ameaçadas, fazendo com que os indivíduos de sexos e espécies diferentes possam cruzar mais frequentemente, já que se tomam raros os encontros de indivíduos de mesma espécie (VILAÇA *et al.*, 2012). A hibridização pode gerar indivíduos com menor sobrevivência e/ou viabilidade reprodutiva e aumentar a chance de extinção das espécies, principalmente aquelas que já estão com uma população muito diminuída (ALLENDORF *et al.*, 2001). Este resultado negativo da hibridização é conhecido como depressão exogâmica, que também pode ser visto em alguns cruzamentos intraspecíficos, quando este se dá entre indivíduos de populações divergentes e com adaptações locais diferentes, como entre as duas ESUs de peixe-boi-marinho (Figura 4).

Por causa das várias diferenças citogenéticas, genômicas, morfológicas e ecológicas (adaptações) entre as duas espécies sul-americanas de peixe-boi, estes híbridos devem possuir baixa viabilidade e fertilidade na natureza. No entanto, visto que foi encontrado pelo menos um híbrido de segunda geração (VIANNA *et al.*, 2006a; PARR *et al.*, 2012), parece não haver infertilidade completa entre as fêmeas híbridas F1, possibilitando que os genes de uma espécie possam ser transferidos para a outra, resultando no fenômeno da introgressão. Assim, alguns indivíduos desta área de hibridização no litoral ao redor da foz do Amazonas (Figura 4) podem ser animais introgressados de geração F2 ou mais, que podem ocupar um nicho parecido ao das espécies parentais. De qualquer forma, a presença de híbridos de sobrevivência reduzida, estéreis ou com baixa fertilidade nesta zona de hibridização deve reduzir bastante o valor adaptativo populacional, que consequentemente, pode levar à extinção local.

Devido à ocorrência de híbridos ao redor da foz do Amazonas e nas áreas costeiras das Guianas (e Amapá), além do Pará e Maranhão, assim como nos trechos fluviais próximos à foz do Rio Amazonas (Figura 4), qualquer translocação ou reintrodução envolvendo indivíduos oriundos desta área deve ser monitorada geneticamente. Isto deve ser feito para evitar a depressão exogâmica nas áreas onde estes animais forem liberados, tanto para as populações de peixe-boi-marinho quanto amazônico. Portanto, caso os indivíduos candidatos à reintrodução sejam identificados como híbridos, eles não deveriam ser reintroduzidos na natureza.

not result in outbreeding depression, except if interspecific hybrids are involved (see below). Therefore, given that a low genetic diversity was demonstrated in the Brazilian population (VIANNA *et al.*, 2006a; LUNA *et al.*, 2012), the translocation of individuals between different areas of the Brazilian coast may be a viable strategy to reduce the loss of diversity from drifting and increased local inbreeding.

However, another significant conservation concern arose in South America with the detection of interspecific hybridization between the Amazonian and West Indian manatees (VIANNA *et al.*, 2006a). It is a known fact that the process of interspecific hybridization occurs naturally in the evolution of various taxonomic groups (ALLENDORF *et al.*, 2001). This phenomenon, however, may be triggered by anthropogenic actions that promote the decline of endangered species populations, causing individuals of different sexes and species to come across more often, since the meetings of individuals of the same species become rarer (VILAÇA *et al.*, 2012). Hybridization can generate individuals with lower survival and/or reproductive viability and increase the chance of species extinction, mainly for those populations that are already reduced (ALLENDORF *et al.*, 2001). This negative result of hybridization is known as outbreeding depression, and can also be observed in some intraspecific breeding, when this occurs between individuals of differing populations with different local adaptations, such as between the two West Indian manatee ESUs (Figure 4).

Because of the multiple cytogenetic, genomic, morphological and ecological (adaptations) differences between the two South American manatee species, these hybrids should have low viability and fertility in nature. However, since at least one second generation hybrid has been found (VIANNA *et al.*, 2006a; PARR *et al.*, 2012), it seems there is no complete infertility among the F1 hybrid females, enabling the genes of a species to be transferred to another, resulting in the phenomenon of introgression. Thus, some individuals of this hybridization area on the coast around the mouth of the Amazon (Figure 4) can be introgressed animals of F2 generation or more, which may occupy a niche similar to that of the parental species. In any case, the presence of hybrids of reduced survival, sterile or with low fertility in this hybridization zone should greatly reduce the population's adaptive value, which, consequently, can lead to local extinction.

Due to the occurrence of hybrids around the mouth of the Amazon and in the coastal areas of the Guianas (and Amapá), besides Pará and Maranhão, as well as in the fluvial stretches near the mouth of the Amazon River (Figure 4), any reintroduction or translocation involving individuals originating from this area must be genetically monitored. This must be done to avoid exogamous depression in areas where these animals are released, for both the West Indian and the Amazonian manatee populations. Therefore, individuals identified as hybrids should not be reintroduced to nature.