



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**VARIAÇÃO MORFOMÉTRICA E FILOGENIA MOLECULAR DE TRÊS
ESPÉCIES DE *ELAENIA* (TYRANNIDAE, AVES)**

Eliane Luiz de Freitas

Brasília – DF

2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**VARIAÇÃO MORFOMÉTRICA E FILOGENIA MOLECULAR DE TRÊS
ESPÉCIES DE *ELAENIA* (TYRANNIDAE, AVES)**

Eliane Luiz de Freitas
Orientador: Dr. Renato Caparroz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Brasília – DF

2016

“Cada descoberta científica é uma pequena história de aventura. Partindo da segurança de um lugar conhecido, a expedição penetra em território inexplorado. O que se encontra pode ser imprevisto ou inacreditável. Muitas vezes a aventura é apenas divertida, outras vezes nos força a mudar crenças centenárias. As implicações do que encontramos podem ser morais, políticas ou deliciosamente práticas.”

Fernando Reinach

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao meu orientador, Renato Caparroz, pela oportunidade de me aceitar em seu grupo como aluna, mesmo sabendo de minhas limitações em relação à área de pesquisa e ao tema, que confiou que eu seria capaz de executar este trabalho, pelo crescimento acadêmico e pessoal nestes dois anos, pelo apoio, paciência, desafios e, principalmente, pelos ensinamentos.

A todos alunos e professores do Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília pela ajuda em laboratório, em campo, por nossas discussões acadêmicas e não acadêmicas, pelas sugestões, correções e também churrascos, aniversários e intermináveis cafés na copa. Também gostaria de agradecer ao pessoal “do lado” e do corredor, em especial, Mariana Marzullo, Marcella Motta e Marcos – Triste pelas conversas, apoio, almoços e lanches coletivos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Processos: 457444/2012-6, 564036/2010-2 e concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado). A todo o Departamento de Genética e Morfologia, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e aos funcionários da Universidade de Brasília, que me deram suporte para a execução deste trabalho.

Ao professor Luis Fábio Silveira, curador do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), e seu grupo, pela oportunidade e acolhimento para a coleta das medidas morfométricas utilizadas neste trabalho.

Aos diretores e funcionários das unidades de conservação, Jardim Botânico de Brasília - DF, Reserva Ecológica do IBGE - DF, Estação Ecológica de Águas Emendadas – DF, Parque Nacional de Emas- GO, Parque Nacional Grande Sertão Veredas – MG/BA, Parque Nacional da Chapada Guimarães – MT, Universidade Estadual do Mato Grosso – UNEMAT, Fazenda Experimental do Cerrado da Embrapa Amapá, fazendas e demais colaboradores, que tornaram possíveis as coletas de amostras para utilização neste estudo.

À equipe do LabGenBio, em especial, Gi, Rosana e Samira, pela ajuda com coletas, organização de material, extrações de DNA e todo o trabalho de bancada o qual eu não era habituada. À Priscila pela ajuda com as sexagens moleculares. À Mariane por ter iniciado os estudos com as *Elaenia*.

Ao professor Miguel Marini pelo empréstimo e à Gabriela Corrêa pela coleta de amostras na Estação Ecológica de Águas Emendadas – DF.

A todos os professores que tive, desde a alfabetização até as disciplinas da pós-graduação, que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal. Em especial, ao professor Hamilton que me despertou o interesse pela biologia logo no ensino fundamental, à Uilene que tornou a física mais leve e ao inesquecível episódio do *log* e às professoras Maria Rita, Zara e Malu, que me acompanharam por toda a graduação, pela oportunidade de participar de um projeto tão incrível como o PIBID-Bio desde o seu início, nos subsolos do Minhocão até o último ano de minha graduação, por terem me apresentado à ciência e à divulgação científica, muito obrigada.

Aos amigos em geral, da escola, de graduação, de cursinho e da vida, que entenderam meu “sumiço” em alguns períodos destes dois anos, pela paciência, às vezes

nem tanta, quando eu precisei trabalhar em datas especiais, aniversários ou mesmo por faltar em tantos encontros.

Às amigas de infância Ady e Si, pelo apoio quando a situação esteve difícil, por nossos encontros e desencontros, conversas, e especialmente pela amizade por todo este tempo, mesmo nossas vidas tomando caminhos tão diferentes.

Aos goianos do meu coração, Rosana, Diogo e Gi, por todos os momentos maravilhosos e pela amizade, sem dúvidas são irmãos que a vida me deu. Diogo, obrigada por cada quinta *gourmet*. Rosana, obrigada por cada final de semana no Lab, pelas dicas e por nos levar para os bares quando tudo ficava difícil, ainda vamos para Paris rir muito de tudo isso. Gi, sei que te devo muitas cervejas como pagamento por tanta ajuda, mas, especialmente, obrigada pela companhia dentro e fora do Lab, pela ajuda com o trabalho de bancada e pela viagem a São Paulo, pelo abrigo e por me alimentar tantas vezes.

À Thaiz, pela companhia, pelas piadas, recadinhos, e nossas discussões filosóficas, também, obrigada pelas broncas, elas foram essenciais para continuar neste caminho. À Flávia, pela companhia nos exercícios físicos e também na comilança, obrigada pelos ensinamentos não só para a vida acadêmica, mas também para a vida pessoal, obrigada pela disponibilidade em ajudar. À Niara, que mesmo pelo curto período de convivência me ensinou muito. À Vivian, pela ajuda com as análises, ensinamentos e pelas conversas sobre o futuro. À Flávia Christina, pelas revisões e conversas sobre a vida.

À Juma, que me ajudou nos momentos mais difíceis neste último ano, companheira de vida. Obrigada pela paciência, compreensão e ajuda.

Ao Getúlio, meu namorado, pelo companheirismo, amizade, amor, carinho e paciência por todo esse tempo, obrigada pelas discussões científicas e não científicas, pela ajuda com este trabalho, pela compreensão nos momentos difíceis e por compartilhar momentos inesquecíveis durante esta caminhada.

Finalmente, agradeço aos meus pais, Irany e Gilberto, por todo amor e paciência, pelo exemplo de vida, por me apoiarem nas minhas decisões, mesmo quando não lhes pareciam adequadas, por todo suporte em cada momento bom ou ruim de minha vida. Por sempre terem se esforçado para me garantir a melhor educação, essa que eles não tiveram. Obrigada a minha família por todo suporte e acolhimento.

Minhas desculpas a quem posso ter me esquecido de mencionar nessa hora, mas agradeço a todos que foram importantes para esta conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ANEXOS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVO GERAL.....	19
Objetivos específicos.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
Amostragem	19
Análises estatísticas das medidas morfométricas	23
Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	24
Análises genéticas.....	25
RESULTADOS	26
Morfometria.....	26
<i>Estatística descritiva dos dados</i>	26
<i>Testes estatísticos</i>	28
Relações filogenéticas	36
Sexagem Molecular	41
DISCUSSÃO	42
Morfometria.....	42
Análises filogenéticas	43
CONCLUSÕES	45
BIBLIOGRAFIA	47
ANEXOS	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação das características morfológicas e distribuição geográfica das três espécies do gênero *Elaenia*, alvo deste trabalho: (A) *E. cristata*, (B) *E. chiriquensis* e (C) *E. flavogaster*. Ilustrações retiradas do *Handbook of the Birds of the World* (del Hoyo *et al.*, 2015) com adaptações. A área em que a espécie é encontrada durante todo o ano está representada pela cor verde, enquanto que a área onde a espécie é encontrada somente na estação reprodutiva (cor amarela) está indicada por uma seta em (B). 17
- Figura 2.** Locais de coleta das amostras de tecido e das medidas morfométricas das espécies de *Elaenia* alvos deste estudo: *E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster*.... 21
- Figura 3.** Fluxograma do uso das amostras de tecido e informações biológicas obtidas em campo e na coleção ornitológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). EC = *Elaenia cristata*, ECH = *Elaenia chiriquensis*, EF = *Elaenia flavogaster*. 23
- Figura 4.** Estatística descritiva (*quartis* superior e inferior, e mediana) das características morfológicas analisadas para as três espécies de *Elaenia* alvos deste estudo obtida com o programa IBM SPSS *statistics*. No canto superior direito de cada gráfico é apresentado o tamanho amostral considerado em cada análise: *Elaenia cristata* (EC) – azul, *Elaenia chiriquensis* (ECH) – verde e *Elaenia flavogaster* (EF) – amarelo. Nos gráficos, são mostrados também os *outliers* (números dispersos nos gráficos). 27
- Figura 5.** Histogramas da distribuição da frequência dos dados gerados pelo programa IBM SPSS para as medidas de comprimento da asa (linha superior) e comprimento da cauda (linha inferior) para as três espécies de *Elaenia* alvos deste estudo: *E. cristata* (azul), *E. chiriquensis* (verde) e *Elaenia flavogaster* (amarelo). Ao lado, são mostrados valores média, desvio e N amostral considerado na análise..... 29
- Figura 6.** Histogramas da distribuição da frequência dos dados gerados pelo programa IBM SPSS para as medidas de comprimento do tarso (linha superior) e comprimento do bico (linha inferior) para as três espécies de *Elaenia* alvos deste estudo: *E. cristata* (azul), *E. chiriquensis* (verde) e *Elaenia flavogaster* (amarelo). Ao lado, são mostrados valores média, desvio e N amostral considerado na análise. 30
- Figura 7.** Histogramas da distribuição da frequência dos dados gerados pelo programa IBM SPSS para as medidas de largura do bico (linha superior) e altura do bico (linha inferior) para as três espécies de *Elaenia* alvos deste estudo: *E. cristata* (azul), *E.*

chiriquensis (verde) e *Elaenia flavogaster* (amarelo). Ao lado, são mostrados valores média, desvio e N amostral considerado na análise. 31

Figura 8. Representação da análise discriminante linear (LD1 e LD2) gerada para as espécies *Elaenia chiriquensis* (vermelho), *Elaenia cristata* (verde) e *Elaenia flavogaster* (azul) com base nas seis medidas morfológicas. 35

Figura 9. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana, gerada pelo programa BEAST V.1.8.2 utilizando a MATRIZ1025 de haplótipos para o gênero *Elaenia* e grupos externos para o gene mitocondrial ND2, com o modelo de evolução HKY, 20 milhões de gerações. Em destaque, os clados de interesse para este trabalho (Verde = *E. chiriquensis*, Amarelo = *E. flavogaster*, Azul = *E. cristata*, Rosa = grupo externo, Marrom = Haplótipo compartilhado por *E. chiriquensis*/*E. flavogaster*, Vermelho = Haplótipo compartilhado por *E. chiriquensis*/*E. cristata*, Roxo = Haplótipo compartilhado por *E. flavogaster*/*E. cristata*). A relação de indivíduos pertencentes aos haplótipos é encontrada no anexo 1. Nos nós das linhagens de interesse é mostrada a probabilidade *a posteriori*/bootstrap. A escala de tempo é mostrada abaixo da topologia..... 39

Figura 10. Detalhe da clado referente à espécie *E. chiriquensis* retirado da árvore filogenética de Inferência Bayesiana, gerada pelo programa BEAST V.1.8.2, utilizando a MATRIZ1025 de haplótipos para o gênero *Elaenia* e grupos externos para o gene mitocondrial ND2. Verde = *E. chiriquensis* - EC, Amarelo = *E. flavogaster* - EF, Azul = *E. cristata* - EC, Marrom = Haplótipo compartilhado por *E. chiriquensis*/*E. flavogaster*, Vermelho = Haplótipo compartilhado por *E. chiriquensis*/*E. cristata*, Roxo = Haplótipo compartilhado por *E. flavogaster*/*E. cristata*, GB = sequências do *Genbank*, siglas dos estados de coletas. No nó é mostrada a probabilidade *a posteriori*/ bootstrap. 40

Figura 11. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana gerada pelo programa BEAST V.1.8.2 utilizando a MATRIZ1025 para o gênero *Elaenia* e grupos externos para o gene mitocondrial ND2. Em destaque os clados de interesse para este trabalho (Verde = *E. chiriquensis*, Amarelo = *E. flavogaster*, Azul = *E. cristata* e Rosa = grupo externo). Nos nós é mostrado o tempo de divergência entre as linhagens. Nos clados é mostrado o valor de erro em 95% HPD. Os terminais foram colapsados para melhor visualização das relações. Escala em milhões de anos. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de indivíduos das espécies de <i>Elaenia</i> caracterizado morfológicamente neste estudo por estado do Brasil.	22
Tabela 2. Resultados do teste de <i>Shapiro-Wilk</i> para verificação da normalidade dos dados morfométricos para cada medida e para cada espécie feito no programa IBM SPSS <i>statistics</i>	32
Tabela 3. Matriz de correlação dos dados morfométricos gerada com o pacote MASS no programa R.	33
Tabela 4. Coeficientes discriminantes lineares (LD1 e LD2) para cada medida obtidos pela análise discriminante linear gerada no programa R entre as espécies <i>Elaenia cristata</i> , <i>Elaenia chiriquensis</i> e <i>Elaenia flavogaster</i>	34
Tabela 5. Probabilidades a posterior (%) de atribuição para os indivíduos de <i>E. cristata</i> , <i>E. chiriquensis</i> e <i>E. flavogaster</i> que apresentaram discordância, entre a identificação morfológica e o dado genético, com base no modelo linear discriminante.....	36
Tabela 6. Indivíduos sexados molecularmente para as espécies <i>E. cristata</i> , <i>E. chiriquensis</i> e <i>E. flavogaster</i> . Os clados referem-se às linhagens mostrados na figura 9.	42

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Informações sobre as amostras utilizadas nesta pesquisa para as análises filogenéticas. Sequências retiradas do banco de dados <i>GenBank</i> possuem número de acesso, sequências geradas por nós constam na coluna <i>Voucher</i> o número de tomo dessa amostra na coleção do LabGenBio. O local de coleta, para nossas amostras e para as retiradas do <i>GenBank</i> , quando disponível. As colunas haplótipos MATRIZ1025 e MATRIZ546 correspondem a qual haplótipo cada amostra pertence dependendo da matriz analisada. A coluna análise morfometria refere-se à se determinada amostra também foi usada nas análises da morfometria ou não.....	51
Anexo 2. Tabela com os números de tomo/voucher por espécie de cada indivíduo utilizado nas análises morfométricas coletados na coleção ornitológica do Museu de Zoologia da USP – MZUSP.	68
Anexo 3. Modo de coleta das medidas morfométricas para as espécies <i>E. cristata</i> , <i>E. chiriquensis</i> e <i>E. flavogaster</i> utilizadas neste estudo.	69
Anexo 4. Relação de iniciadores (<i>primers</i>) utilizados nesse estudo para amplificação do gene mitocondrial ND2 e para a sexagem molecular, a sequência do <i>primer</i> e a referência.	70
Anexo 5. Estatística descritiva da morfometria das espécies de <i>Elaenia</i> alvos deste estudo. Todas as medidas estão em milímetros.	71
Anexo 6. Análise de variância – ANOVA para as espécies <i>Elaenia cristata</i> , <i>Elaenia chiriquensis</i> e <i>Elaenia flavogaster</i> geradas com o pacote MASS no programa R.....	72
Anexo 7. Teste de <i>Tukey</i> da diferença honestamente significativa (HSD) gerado com o pacote MASS no programa R para verificar a diferença estatística entre as espécies com base nas medidas.	72
Anexo 8. Árvore obtida pelo método de Verossimilhança para a MATRIZ1025, com 160 haplótipos do gênero <i>Elaenia</i> e grupos externos, usando os parâmetros de:1000 réplicas de <i>bootstrap</i> ; modelo de Tamura-Nei; uso de distribuição <i>gamma</i> e sítios invariáveis; deleção parcial; uso das três bases; Valores de <i>bootstrap</i> do nó para <i>E. chiriquensis</i> = 99; <i>E. flavogaster</i> = 99; <i>E. cristata</i> = 100.	73
Anexo 9. Árvore obtida pelo método de Verossimilhança para a MATRIZ546, com 129 haplótipos do gênero <i>Elaenia</i> e grupos externos, usando os parâmetros de:1000 réplicas de <i>bootstrap</i> ; modelo de Tamura-Nei; uso de distribuição <i>gamma</i> e sítios invariáveis;	

deleção parcial; uso das três bases; Valores de bootstrap do nó para *E. chiriquensis* = 97;
E. flavogaster = 99; *E. cristata* = 99. 74

RESUMO

A ordem Passeriformes agrupa cerca de 60% das espécies de aves. É uma das ordens com maior dificuldade na compreensão das relações filogenéticas entre os táxons devido às mínimas diferenças morfológicas, que estendem-se para famílias e gêneros. O gênero *Elaenia* é composto por 18 espécies e 38 subespécies, as quais apresentam morfologia uniforme, de coloração basicamente verde-oliva e com poucas variações entre cristas projetadas e pouca coloração branca ou amarela nestas cristas. Estas espécies estão amplamente distribuídas nas Américas sendo que muitas delas apresentam grande área de sobreposição de suas distribuições. A dificuldade de diferenciação morfológica entre alguns táxons deste gênero, torna a identificação destas espécies uma tarefa difícil em áreas de simpatria. Além disso, a possível ocorrência de híbridos pode dificultar ainda mais a diferenciação destes táxons. Diante disso, este trabalho teve por objetivo verificar o nível de diferenciação morfométrica e a existência de híbridos entre três espécies do gênero *Elaenia*: *E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster*. Para as análises morfométricas, foram amostrados 636 indivíduos das três espécies alvo deste estudo. Foram coletadas seis medidas morfológicas de cada indivíduo. O nível de diferenciação morfométrico das espécies foi verificado pelos testes de variância multivariada – MANOVA, análise de variância – ANOVA seguida de teste de Tukey, análise discriminante linear – LDA e construção e validação do modelo de atribuição. Erros de identificação e possíveis híbridos foram investigados por meio da análise da variação de sequências do gene mitocondrial ND2. Para tanto, foram selecionados 99 indivíduos das três espécies alvo amostrados em campo. Morfometricamente, houve diferença estatística significativa quando *E. chiriquensis* foi comparada à *E. cristata* e *E. flavogaster*. O modelo de atribuição teve performance de acerto de 83% de atribuições corretas para a espécie *E. chiriquensis*, 81% para *E. flavogaster* e 76% para *E. cristata*. As reconstruções filogenéticas por Máxima Verossimilhança e por Inferência Bayesiana indicam que as três espécies constituem linhagens independentes. A estimativa do tempo de divergência entre as linhagens foi de aproximadamente 7,82 milhões de anos para *E. cristata*, 3,91 milhões de anos para *E. flavogaster* e 3,39 milhões de anos para *E. chiriquensis*. Alguns indivíduos identificados morfologicamente em campo como *E. flavogaster* e *E. cristata*, mostraram compartilhamento de haplótipos para o gene mitocondrial ND2 referente à linhagem de *E. chiriquensis*. Erros de identificação, ocorrência de híbridos ou possível dimorfismo sexual podem ser explicações para estes casos.

Palavras-chave: *Elaenia*, filogenia, morfometria.

ABSTRACT

Passeriformes order has about 60% of all bird species. This order is one of the most difficult to understand the phylogenetic relationships among taxa due to minimal morphological differences, these difficulties extend to families and genera. The *Elaenia* genus composed of 18 species and 38 subspecies, which shown uniform morphology, characterized by olive coloring and little variation in the color of the crest, ranging from white to yellow. These species are widely distributed in the Americas, many of which has large area of overlap of their distributions. The difficulty of morphological differentiation between some taxa of this genus makes identification of these species a difficult task in areas of sympatric. Furthermore, the possible occurrence of hybrids can further complicate the differentiation of these taxa. This study aims to determine the level of morphometric and hybrid occurrence between three species of the genus *Elaenia*: *E. cristata*, *E. chiriquensis* and *E. flavogaster*. For morphometric analysis, we collected 636 individuals of the three species. Six morphological measurements of each individual were performed. The level of morphometric differentiation of species was identified by multivariate variance Tests - MANOVA, analysis of variance - ANOVA followed by Tukey's test, linear discriminant analysis - LDA, construction and validation of the attribution model. Misidentification and possible hybrids were investigated by analyzing the sequence variation of mitochondrial gene ND2, we selected 99 individuals from the three target species sampled in the field. There was a statistically significant morphometric difference between *E. chiriquensis* and *E. cristata* and *E. flavogaster*. The attribution model had 83% correct performance of correct assignments for *E. chiriquensis*, 81% for *E. flavogaster* and 76% for *E. cristata*. Phylogenetic reconstructions were created using maximum likelihood and Bayesian Inference. Results indicated independents lineages for all three species. The estimated time of divergence between the lineages was approximately 7.82 million years for *E. cristata*, 3.91 million years for *E. flavogaster* and 3.39 million years for *E. chiriquensis*. Some individuals morphologically identified in the field as *E. flavogaster* and *E. cristata* shared the same haplotype for *E. chiriquensis* lineage for mitochondrial gene ND2. Misidentification, hybrids occurrence or possible sexual dimorphism may be explanations for these cases.

Keywords: *Elaenia*, phylogeny, morphometry.

INTRODUÇÃO

A ordem Passeriformes agrupa cerca de 60% das espécies de aves (Jarvis *et al.*, 2014). Estudos recentes indicam que essa ordem tenha divergido há aproximadamente 39 milhões de anos de seus grupos ancestrais (Jarvis *et al.*, 2014) e possivelmente teve sua origem geográfica na atual América do Sul (Claramunt *et al.*, 2015). Apesar de ser uma das ordens mais ricas em diversidade comportamental e ecológica (del Hoyo *et al.*, 2015), é uma das ordens que apresenta maior dificuldade na compreensão das relações filogenéticas entre táxons de algumas famílias, devido às mínimas diferenças morfológicas em comparação com outras ordens de aves. Entre estas famílias, destaca-se a Tyrannidae (Fitzpatrick, 2015). Sabe-se que mesmo para espécies filogeneticamente distantes, há dificuldade na identificação morfológica de tiranídeos devido às características semelhantes entre as espécies (Chaves *et al.*, 2008).

Em geral, os tiranídeos são de pequeno a médio porte (6-28 cm) e possuem combinações de plumagens variando nas cores de preto, marrom, branco, amarelo ou verde, sendo amplamente distribuídos nas Américas (Fitzpatrick, 2015). Lanyon (1988) realizou estudos filogenéticos importantes em tiranídeos com base em caracteres morfológicos, revisando vários trabalhos anteriores e esclarecendo diversas relações problemáticas entre os grupos. Entre os grupos problemáticos identificados por Lanyon (1988), temos o grupo *Elaenia*, composto por 18 gêneros e 65 espécies.

Outros autores, ao revisarem esse grupo, tanto com uso de morfologia e dados comportamentais (Birdsley, 2002) quanto com dados moleculares (Cicero *et al.*, 2002; Ericson *et al.*, 2006; Rheindt, Norman, *et al.*, 2008b e outros), sugeriram algumas mudanças, como a elevação de subespécies à espécie, assim como casos de ocorrência de espécie críptica, como em *E. chiriquensis* (Rheindt *et al.*, 2015). Em geral, as relações filogenéticas entre os táxons deste grupo mantiveram-se as mesmas, mas ainda há relações não esclarecidas, por exemplo, o polifiletismo em *Elaenia albiceps* e *Elaenia pallatangae* (Rheindt *et al.*, 2009).

Para entender melhor as relações entre as espécies, pesquisadores fazem uso da construção de árvores filogenéticas tendo como fonte de estudo características bioquímicas, morfológicas e moleculares (Campbell *et al.*, 2010). Entre as informações moleculares que podem ser utilizadas para reconstruções filogenéticas, podemos citar o uso de fragmentos de DNA mitocondrial e/ou nuclear, ou até mesmo um grande número de *loci* (e.g.: Rheindt, Norman, *et al.*, 2008b; Jarvis *et al.*, 2014). Por exemplo, o uso de

DNA mitocondrial em estudos evolutivos é empregado há cerca de 30 anos, e essa abordagem vem fornecendo informações importantes sobre o isolamento reprodutivo entre linhagens (ver Kerr *et al.*, 2007). O DNA mitocondrial também pode ser utilizado para verificar padrões de migração e rastreamento de linhagens maternas, devido às características intrínsecas desse marcador (Awise *et al.*, 1987; Frankhan *et al.*, 2006).

De forma similar, estudos filogenéticos foram feitos com uso de fragmentos de DNA nuclear. O trabalho de Irestedt e colaboradores (2006) utilizou três segmentos de DNA nuclear (íntron 2 de mioglobulina, íntrons 6-7 de ornitina descarboxilase e íntron 11 de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - G3PDH), extraídos de tecidos de coleções em museus, para reconstruir a filogenia e os padrões de diversificação de Suboscines do Velho Mundo (Eurylaimides). Além disso, com o avanço da tecnologia e acessibilidade às novas técnicas de sequenciamento, como o sequenciamento de nova geração (NGS), os estudos filogenéticos podem ser feitos utilizando-se maior número de *loci*, possibilitando alcançar resolução das relações entre os táxons de forma mais refinada, como proposto por McCormack *et al.* (2013) e Jarvis *et al.* (2014).

O gênero *Elaenia* é composto por 18 espécies e 38 subespécies. As espécies desse gênero apresentam morfologia uniforme, de coloração basicamente verde-oliva e com poucas variações entre cristas projetadas e pouca coloração branca ou amarela nessas cristas. Essas espécies estão amplamente distribuídas nas Américas, desde o México até o extremo sul da América do Sul (Fitzpatrick, 2015). Algumas dessas espécies, como, por exemplo, *Elaenia cristata*, *Elaenia chiriquensis* e *Elaenia flavogaster*, possuem ampla área de distribuição na região neotropical com grande área de sobreposição, principalmente na América do Sul (Hosner, 2016).

De acordo com a décima primeira edição da lista de aves do Brasil, elaborada pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, há ocorrência de treze espécies do gênero *Elaenia* em território brasileiro (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 2014). Entre essas, apenas *E. ridleyana* é considerada endêmica do Brasil, residente no arquipélago de Fernando de Noronha – PE. Essa é também a única espécie incluída na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção da *International Union for Conservation of Nature* - IUCN, na categoria vulnerável. Todas as outras espécies encontram-se na categoria de não ameaçadas (IUCN, 2015).

Algumas espécies de *Elaenia* apresentam comportamento migratório, como *E. chiriquensis* (De Paiva *et al.*, 2013), enquanto outras são predominantemente residentes, como *E. cristata* (Marini *et al.*, 2009). No caso desta última, há relatos de que algumas

populações apresentam movimentos curtos de deslocamento (Sick, 1997). E ainda, o padrão de comportamento migratório/residente é pouco conhecido para algumas espécies desse gênero, como para *E. flavogaster* (Rheindt, Christidis, *et al.*, 2008).

Alguns estudos foram feitos sobre as preferências de *habitats* e a biologia reprodutiva para essas espécies: *E. cristata* (Marini *et al.*, 2009), *E. flavogaster* (Marini *et al.*, 2012) e *E. chiriquensis* (De Paiva *et al.*, 2013). Porém, apesar do gênero numeroso e abundante, existem poucos estudos que investiguem características mais específicas deste grupo, uma vez que a maioria dos trabalhos traz apenas relatos de ocorrência e observação de espécies.

Rheindt, Christidis, *et al.* (2008) utilizaram segmentos de DNA mitocondrial e nuclear para investigar a história evolutiva do gênero *Elaenia*, com o objetivo de reconstruir as preferências de *habitat* ancestrais para o gênero e resolver alguns conflitos entre relações segundo a classificação tradicional. Em relação à preferência de *habitat*, os resultados mostraram dois clados principais: um com duas espécies especialistas em savana: *E. cristata* e *E. ruficeps*, e outro clado mais diverso, com as outras espécies que ocorrem em savana e em outros *habitats*. Ainda neste trabalho, foram propostas alterações taxonômicas como elevar *E. obscura sordida* e *E. obscura obscura* à nível de espécie, assim como foi identificado variação genética entre *E. chiriquensis brachyptera* e *E. chiriquensis albivertex* suficiente para que sejam tratadas como espécies separadas.

Neste trabalho, iremos focar em três espécies de *Elaenia*: *E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster*. Segundo Rheindt, Christidis, *et al.* (2008) estas espécies são filogeneticamente distantes, ocorrendo em clados distintos nas filogenias do gênero. Contudo, as mesmas apresentam pouca variação morfológica entre si e grande área de sobreposição geográfica, o que torna a diferenciação destes táxons uma tarefa difícil. Desta forma, seguimos abaixo descrevendo primeiramente as características de cada uma dessas espécies, e em seguida enfatizamos as dificuldades de distinção entre elas.

A guaracava-de-topete-uniforme (*Elaenia cristata* Pelzeln, 1868) (Figura 1A) tem em média 14,5 cm de comprimento e pesa por volta de 18 gramas, exibindo crista proeminente, sem coloração branca, geralmente mantida ereta ou projetada para trás (Hosner, 2016). Possui preferência por vegetação do tipo Cerrado típico para a reprodução (Marini *et al.*, 2009). Duas subespécies são reconhecidas: *E. c. cristata* (Pelzeln, 1868) e *E. c. alticola* (J. T. Zimmer & Phelps, Sr, 1946). A primeira ocorre na Venezuela, leste dos Andes e nas Guianas e no extremo leste da Bolívia, considerando-se que ainda existem populações isoladas no sudeste da Colômbia, sudeste do Peru e

extremo oeste da Bolívia (La Paz). No Brasil, essa subespécie ocorre nas regiões norte, central e leste (sul de São Paulo), porém é ausente do oeste à região central da Amazônia. A subespécie *E. c. alticola* ocorre em tepuis no sudeste da Venezuela e em áreas adjacentes ao norte do Brasil (del Hoyo *et al.*, 2015).

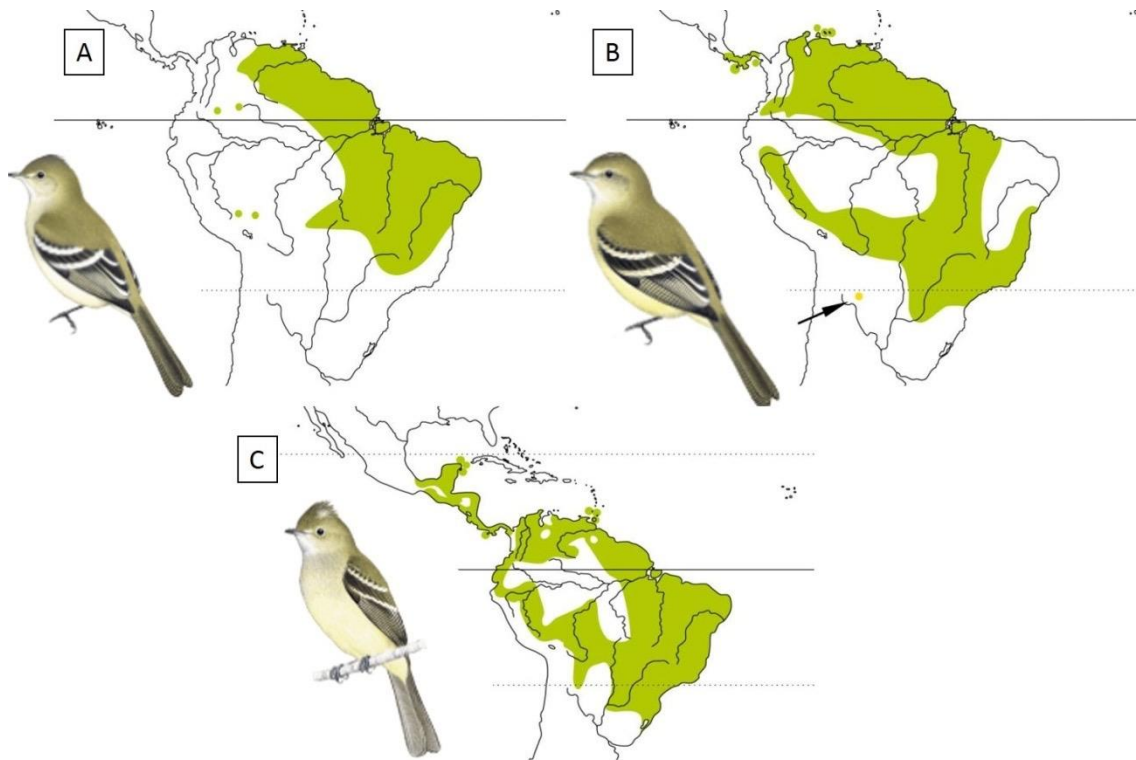


Figura 1. Representação das características morfológicas e distribuição geográfica das três espécies do gênero *Elaenia*, alvo deste trabalho: (A) *E. cristata*, (B) *E. chiriquensis* e (C) *E. flavogaster*. Ilustrações retiradas do *Handbook of the Birds of the World* (del Hoyo *et al.*, 2015) com adaptações. A área em que a espécie é encontrada durante todo o ano está representada pela cor verde, enquanto que a área onde a espécie é encontrada somente na estação reprodutiva (cor amarela) está indicada por uma seta em (B).

Com características de tamanho e peso próximos à anterior, o Chibum (*Elaenia chiriquensis* Lawrence, 1865) (Figura 1B), tem tamanho médio de 13,5 cm e pesa de 13 a 18 gramas. Comumente apresenta pequena crista, com algumas penas brancas. Possui comportamento migratório, com período de reprodução em área de cerrado/savana (De Paiva *et al.*, 2013). São descritas três subespécies: *E. c. chiriquensis* (Lawrence, 1865), com ocorrência na zona tropical da Costa Rica e encosta do Pacífico a oeste do Panamá (leste da Zona do Canal, incluindo as ilhas de Coiba e Pearl); *E. c. brachyptera* (Berlepsch, 1907), ocorre no sudoeste da Colômbia e noroeste do Equador; e *E. c. albivertex* (Pelzeln, 1868), ocorre desde as Antilhas Holandesas, Ilha de Trinidad,

Colômbia, Venezuela, Peru, Bolívia, Paraguai e Argentina. No Brasil, ocorre em localidades por toda região norte, central e leste (sul de São Paulo), aparentemente ausente na região oeste da Bacia Amazônica (del Hoyo *et al.*, 2015).

A guaracava-de-barriga-amarela (*Elaenia flavogaster* Thunberg, 1822) (Figura 1C) possui tamanho variando de 16 a 21cm e pesa em média de 21 a 29 gramas. Possui pequena crista espessa e visível na cabeça, que por vezes abre-se expondo a cor branca. Existem quatro subespécies reconhecidas: *E. f. flavogaster* (Thunberg, 1822), tem ocorrência na Colômbia, Venezuela, Ilha de Trinidad, Tobago, sul das Pequenas Antilhas, o Escudo das Guianas, sudeste do Peru, Bolívia, Paraguai e nordeste da Argentina. No Brasil, ocorre amplamente distribuída, exceto a oeste e região central do Amazonas, e o Rio Grande do Sul; *E. f. subpagana* (PL Sclater, 1860), ocorre no sudeste do México, de leste ao sul de Veracruz e Chiapas, do sul para a Costa Rica e também a sudoeste do Panamá (Ilha de Coiba). *E. f. pallidorsalis* (Aldrich, 1937), ocorre apenas no Panamá e adjacente as ilhas (exceto na ilha de Coiba). *E. f. semipagana* (PL Sclater, 1861), tem registros de ocorrência no extremo sudoeste da Colômbia, oeste e sul do Equador (incluindo ilha de Puna) e no interior do noroeste do Peru (del Hoyo *et al.*, 2015).

Assim, devido às semelhanças morfológicas entre essas três espécies, a identificação torna-se difícil quando baseada apenas em caracteres morfológicos, como a plumagem, e subjetivos, como tamanho da crista, e pequenas variações de coloração, como as penas brancas na região da crista. Além disso, tais semelhanças morfológicas podem ainda dificultar a identificação de ocorrência de hibridação entre estas três espécies, como já relatado por Rheindt *et al.* (2009) para as espécies congêneres *E. pallatangae* e *E. albiceps*. A hipótese de existência de dimorfismo sexual foi levantada por Cueto *et al.* (2015) para espécie congênera *Elaenia albiceps chilensis*, que apesar de não haver dimorfismo sexual relatado, encontrou diferenças morfométricas entre machos e fêmeas. As análises de caracteres morfométricos por meio de função discriminante determinou corretamente o sexo de 90% de machos e 75% de fêmeas, a contraprova foi feita por meio de sexagem molecular.

Então, diante das dificuldades de identificação relatadas e descrição de híbridos entre alguns táxons deste gênero, torna-se eminente a realização de mais estudos envolvendo outras espécies do gênero *Elaenia*.

OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo verificar o nível de diferenciação morfométrica e filogenética entre três espécies do gênero *Elaenia*: *E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster*, visando, com isso, auxiliar na identificação e investigar a ocorrência de erros de identificação, hibridação e dimorfismo sexual nestas espécies.

Objetivos específicos

Obter modelo discriminante que possibilite a diferenciação morfométrica entre os táxons estudados e

Estimar o tempo de divergência entre as linhagens mitocondriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Em campo, 204 indivíduos foram capturados (*E. cristata* = 79, *E. chiriquensis* = 88 e *E. flavogaster* = 37) (Figura 3, Anexo 1) pela equipe de ornitologia do Laboratório de Genética e Biodiversidade da UnB (LabGenBio/UnB). No total, foram obtidas amostras em 10 localidades distribuídas em sete estados brasileiros (Figura 2, Anexo 1). As capturas foram feitas com redes de neblina (12m x 2,5m x 36mm), instaladas próximas ao chão, com o auxílio de varetas metálicas. As aves capturadas foram marcadas com anilhas numéricas únicas cedidas pelo CEMAVE (para evitar a coleta de amostras em duplicata) e soltas após a coleta de informações biológicas e amostras de tecido.

As espécies foram identificadas de acordo com a descrição morfológica em *Handbook of the Birds of the World* (del Hoyo *et al.*, 2015), devido à semelhança morfológica entre as espécies. As diferenças marcantes para a identificação em campo foram: para *E. cristata*, a presença de crista proeminente e nenhuma coloração branca nas penas desta crista; para *E. chiriquensis*, pouca ou nenhuma crista com penas brancas na região da crista; e para *E. flavogaster*, a presença de crista proeminente e penas com coloração branca nessa região. Quando possível, o nível de ossificação do crânio foi utilizado para classificação dos indivíduos em jovens (crânio não ossificado completamente), adultos (crânio ossificado) ou indeterminado (quando não foi possível avaliar).

Para as análises genéticas, foram coletadas de três a quatro gotas de sangue por punção da veia braquial de cada indivíduo, com ajuda de agulha descartável e tubos capilares de vidro. Em seguida, as amostras de sangue foram armazenadas individualmente em microtubos contendo etanol absoluto em temperatura ambiente.

As medidas morfológicas foram obtidas dos 204 indivíduos coletados em campo e de 432 espécimes depositados na coleção ornitológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – MZUSP (Tabela 1, Figura 3, Anexo 2). No caso destes últimos, não houve coleta de tecidos. Alguns espécimens (N = 18) apresentaram divergência entre as identificações morfológica e genética (veja Resultados), sendo retirados das análises estatísticas morfológicas.

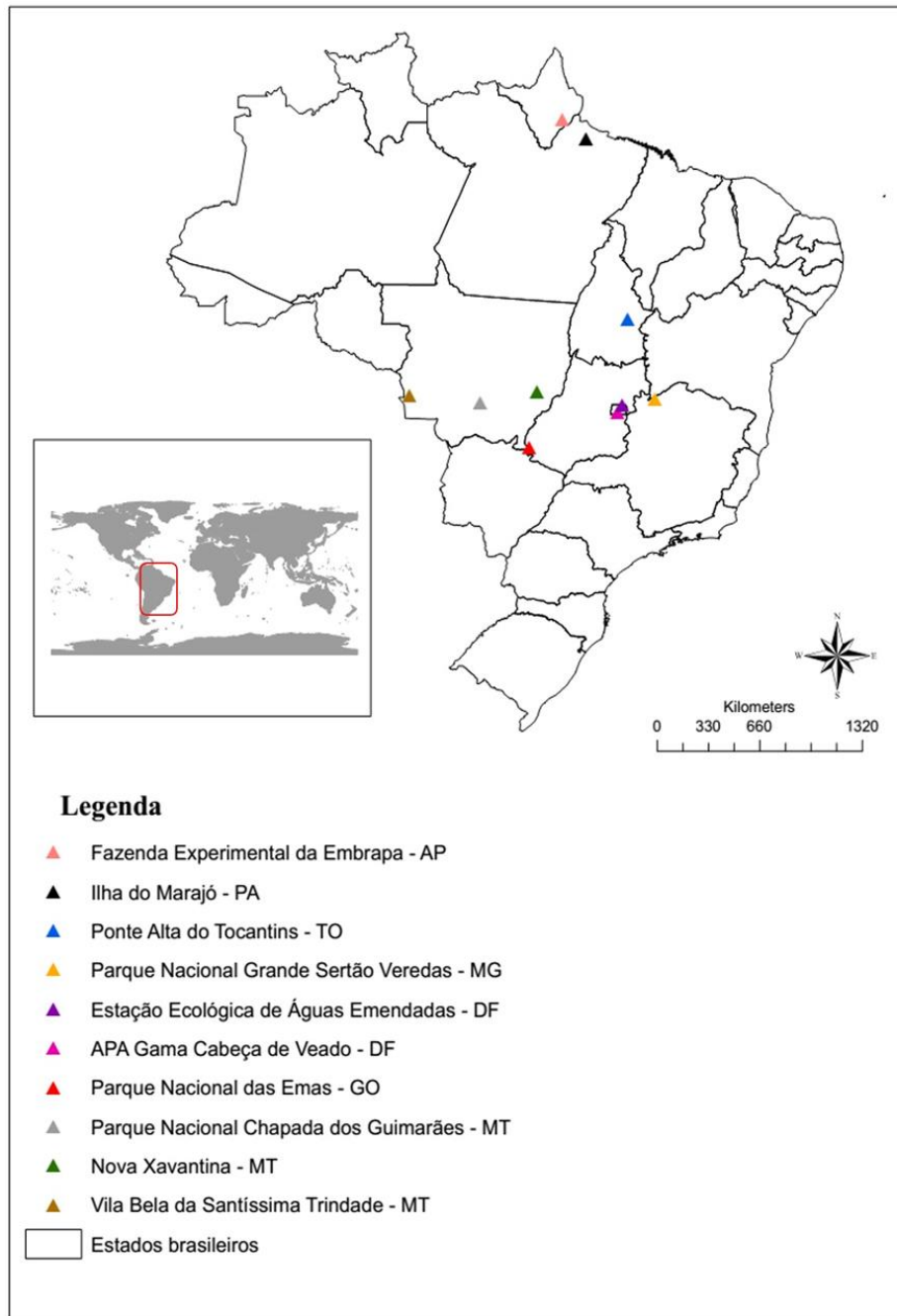


Figura 2. Locais de coleta das amostras de tecido e das medidas morfométricas das espécies de *Elaenia albos* deste estudo: *E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster*.

Tabela 1. Número de indivíduos das espécies de *Elaenia* caracterizado morfológicamente neste estudo por estado do Brasil.

Estado	Espécie		
	<i>Elaenia cristata</i>	<i>Elaenia chiriquensis</i>	<i>Elaenia flavogaster</i>
Alagoas - AL	00	01	03
Amapá - AP	31	02	32
Amazonas - AM	02	08	00
Bahia - BA	04	05	05
Distrito Federal - DF	20	77	14
Goiás - GO	10	26	36
Maranhão - MA	01	01	00
Mato Grosso - MT	28	16	19
Mato Grosso do Sul - MS	00	02	02
Minas Gerais - MG	11	01	29
Pará - PA	25	32	35
Paraíba - PB	03	00	00
Paraná - PR	00	01	00
Pernambuco - PE	01	00	00
Piauí - PI	15	00	05
Roraima - RR	06	02	06
São Paulo - SP	03	24	56
Tocantins - TO	16	12	02
Local não identificado	03	02	01
Total por espécie	179	212	245

Os indivíduos coletados em campo e na coleção ornitológica do MZUSP foram medidos usando paquímetro digital e preferencialmente medidos pela mesma pessoa para diminuir as diferenças na amostragem. As medidas coletadas foram: (1) comprimento da asa – do encontro até o final da pena mais longa da asa esquerda; (2) comprimento da cauda – do uropígio até o final da pena mais longa da cauda; (3) comprimento do tarso;

(4) largura do bico – largura do bico na base; (5) comprimento do bico – da narina até a ponta e (6) altura do bico na base (detalhes Anexo 3).

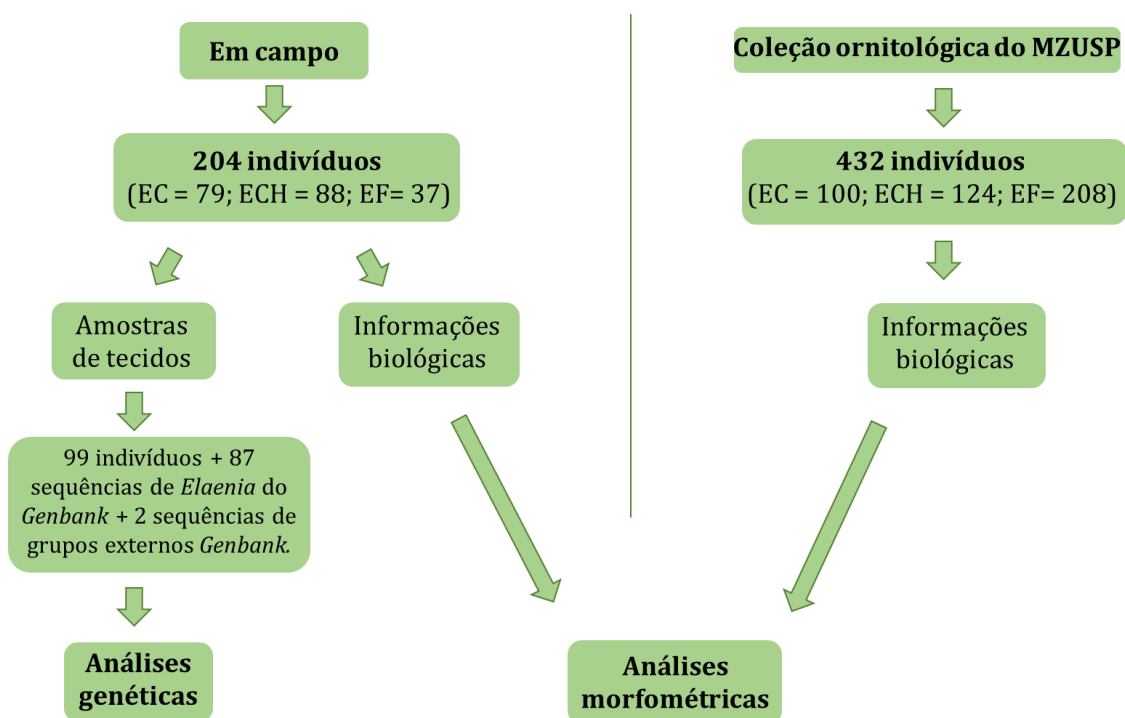


Figura 3. Fluxograma do uso das amostras de tecido e informações biológicas obtidas em campo e na coleção ornitológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). EC = *Elaenia cristata*, ECH = *Elaenia chiriquensis*, EF = *Elaenia flavogaster*.

Análises estatísticas das medidas morfométricas

As medidas utilizadas na análise estatística foram comprimento da asa, comprimento da cauda, comprimento do tarso, comprimento do bico, largura do bico e altura do bico. A estatística descritiva foi calculada para cada espécie e para cada medida, a média e o desvio padrão dos dados. A mediana, distribuição, quartis e *outliers* dos dados foram mostrados em gráficos do tipo *boxplot*. A normalidade dos dados foi visualizada por histogramas e analisada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Essas análises estatísticas foram feitas utilizando o programa IBM SPSS *statistics* versão 22.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Released 2013).

A diferenciação morfométrica entre as espécies foi feita com base em testes estatísticos usando o pacote MASS (Brian Ripley *et al.*, 2015) no programa R (R Core Team, 2015), como descrito a seguir.

Os dados foram transformados para *log* e verificada a correlação entre as variáveis selecionadas por meio da matriz de correlação. Para verificar a hipótese de diferença

morfométrica entre as espécies alvo, foi feita análise de variância multivariada – MANOVA. Em seguida, foi realizada a análise de variância – ANOVA por espécie, usando todas as medidas de forma conjunta, seguida do teste de *Tukey*. Para as análises multivariadas, os indivíduos que possuíam alguma medida faltante foram removidos dessas análises. Para verificar a separação espacialmente das três espécies com base nas medidas, foi feita análise discriminante linear – LDA, e para essa análise, os dados foram escalonados. Foi construído e validado o modelo de atribuição e predição para as espécies utilizando as seis medidas. Os indivíduos que divergiram na identificação morfológica e genética foram testados no modelo de atribuição com a função *predict*.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Para as análises genéticas, foram selecionados 99 indivíduos (*E. cristata* = 53, *E. chiriquensis* = 17 e *E. flavogaster* = 29) que continham medida morfométrica, foto ou *voucher*. Inicialmente, o DNA total de cada amostra foi extraído individualmente utilizando o procedimento padrão de digestão com proteinase K, seguido de purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), de acordo com (Bruford *et al.*, 1992). Um fragmento de DNA mitocondrial, o gene desidrogenase subunidade 2 (ND2), foi amplificado por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando os pares de iniciadores LMET/ H6313 e os iniciadores internos L5758/ H5766 (Sorenson *et al.*, 1999) (Anexo 4).

A amplificação do ND2 foi feita por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em um volume final de 10 µL contendo 1,0 µL de DNA de cada indivíduo (30-40 ng), 1,0 µL de solução tampão (10x), 1,0 µL de dNTPs (200µM), 1,0 µL de *primer (forward)* a 10 µM, 1,0 µL de *primer (reverse)* a 10 µM, 0,5 µL de MgCl₂ (50µM), 0,1 µL de Taq polimerase (5U/µL) e 4,4 µL de água milli-Q. O ciclo utilizado para as reações de amplificação foi inicialmente 95°C por 7 minutos, 35 ciclos compostos por 1 minuto à 95°C para desnaturação, 40 segundos à 52°C para hibridação e 1 minuto à 72°C para extensão, seguindo extensão de 10 minutos à 72°C.

Os produtos de PCR foram purificados por reação enzimática com exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão (Exol/SAP, USB), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR amplificados e purificados foram sequenciados utilizando o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. O

sequenciamento foi feito no Centro de Genômica do Centro-oeste, na Universidade Católica de Brasília – UCB. As sequências obtidas foram analisadas e corrigidas individualmente com o programa GENEIOUS V. 6.0.5 (Kearse *et al.*, 2012).

Oitenta e nove sequências de *Elaenia* presentes no *GenBank* também foram analisadas neste trabalho. Dessas, 22 são das espécies alvo (duas sequências de *E. cristata*, 11 de *E. chiriquensis* e 9 de *E. flavogaster*), 65 sequências de outras espécies do gênero e uma de cada um dos grupos externos (*Camptostoma obsoletum* e *Capsiempis flaveola*) utilizados nas análises filogenéticas. Estes últimos foram selecionados por serem grupos irmãos do gênero e por terem sido usados em outro estudo filogenético em *Elaenia* (Rheindt, Norman, *et al.*, 2008b). No total, as matrizes de dados continham sequências de 188 indivíduos (veja Anexo 1).

Tendo em vista possível caso de dimorfismo sexual, foi feita a sexagem molecular de 67 indivíduos (EC = 20, ECH = 17 e EF = 30) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) segundo descrito por Fridolfsson *et al.* (1999). As reações foram feitas em um volume final de 10 µL contendo 1,0 µL de DNA de cada indivíduo (30-40 ng), 1,0 µL de solução tampão (10x), 1,0 µL de dNTPs (200µM), 1,0 µL de *primer (forward)* a 10 µM, 1,0 µL de *primer (reverse)* a 10 µM, 0,5 µL de MgCl₂ (50µM), 0,1 µL de Taq polimerase (5U/µL) e 4,4 µL de água milli-Q. O ciclo utilizado para as reações de amplificação foi inicialmente 95°C por 7 minutos, 35 ciclos compostos por 1 minuto à 95°C para desnaturação, 40 segundos à 50°C para hibridação e 1 minuto à 72°C para extensão, seguindo extensão de 10 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose a concentração de 3%.

Análises genéticas

O alinhamento das sequências foi feito com o algoritmo CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997) no programa BIOEDIT V. 7.2.5 (Hall, 1999). Construímos duas matrizes de dados a partir do alinhamento das sequências: uma com 1.025 sítios (MATRIZ1025), essa priorizando o maior número de sítios mesmo com sequências que não obtiveram esse comprimento total, e outra, com 546 sítios (MATRIZ546), com o mínimo de dados faltantes em relação à MATRIZ1025. A identificação dos haplótipos e as diversidades haplotípica e nucleotídica foram feitas usando o *software* DNASP V. 5.10.01 (Librado *et al.*, 2009). Todas as análises foram realizadas utilizando as duas matrizes de haplótipos.

O monofiletismo das espécies alvo foi investigado por meio de análises filogenéticas com a aplicação dos métodos de Máxima Verossimilhança (ML) com o programa MEGA V. 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) e Inferência Bayesiana (IB) com o programa BEAST V.1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012). Este último também foi utilizado para obtenção das estimativas de tempo de divergência entre as linhagens mitocondriais.

Para a análise de ML, utilizou-se como base uma árvore obtida pelo método de *neighbor-joining* e o método heurístico de busca por *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI). O suporte estatístico dos ramos foi estimado por 1.000 réplicas de *bootstrap*. Para a análise de IB, o segmento foi analisado de forma particionada (considerando cada posição dos códons de forma independente) com o modelo de especiação *Yule Process* e a opção de relógio molecular relaxado exponencial baseado em uma curva normal. A escolha do melhor modelo evolutivo e seus parâmetros foi feita pelo Critério de Informação de Akaike (Akaike, 1974) no programa JMODELTEST V. 2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012). O melhor modelo evolutivo para a MATRIZ1025 foi HKY com variação *gamma*, enquanto que para a MATRIZ546 o modelo selecionado foi Tamura/Nei 93 (TrN93), com variação *gamma* e sítios invariáveis. A taxa de evolução estimada para o ND2 em Passeriformes de 0,0090 por sítio por milhão de anos (Pacheco *et al.*, 2011) foi utilizada para a datação molecular. Foram necessárias 20 milhões de gerações para a MATRIZ1025 e 30 milhões de gerações para a MATRIZ546 para a estabilização das cadeias de Markov (MCMC). Os parâmetros de tamanho amostral efetivo foram avaliados no programa TRACER V 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) e aceito quando o valor fosse igual ou maior a 200. As primeiras 2.000 topologias (20%) foram descartadas (*burn-in*) e as demais foram utilizadas para obtenção de árvore consenso pelo método de consenso de maioria.

RESULTADOS

Morfometria

Estatística descritiva dos dados

No total, utilizamos medidas de 636 indivíduos: 179 de *E. cristata*, 212 de *E. chiriquensis* e 245 de *E. flavogaster*. O número de *outliers* foi maior nas medidas do bico (figura 4), porém esse valor não ultrapassou 5,2% do total da amostra. Como pode ser visto na Figura 4, a espécie *E. chiriquensis* apresenta os menores valores para a maioria das medidas em relação às outras duas espécies. As espécies *E. cristata* e *E. flavogaster*

apresentam distribuição de valores semelhantes porém, a espécie *E. flavogaster* apresenta maiores valores para os comprimentos de asa, cauda e tarso, enquanto a espécie *E. cristata* apresenta os maiores valores para as medidas relacionadas ao bico (Comprimento, largura e altura do bico).

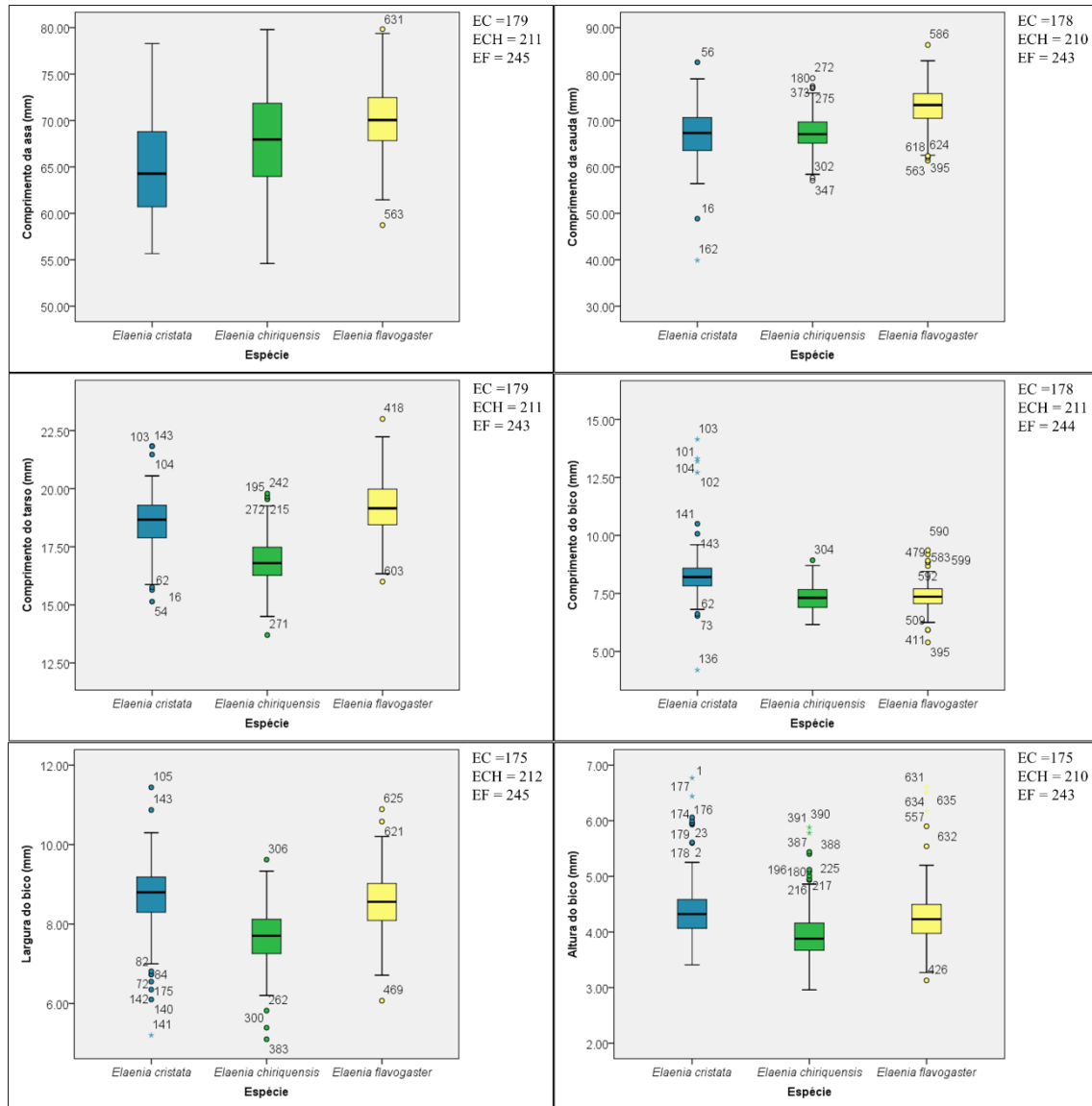


Figura 4. Estatística descritiva (*quartis superior e inferior, e mediana*) das características morfológicas analisadas para as três espécies de *Elaenia* alvos deste estudo obtida com o programa IBM SPSS *statistics*. No canto superior direito de cada gráfico é apresentado o tamanho amostral considerado em cada análise: *Elaenia cristata* (EC) – azul, *Elaenia chiriquensis* (ECH) – verde e *Elaenia flavogaster* (EF) – amarelo. Nos gráficos, são mostrados também os *outliers* (números dispersos nos gráficos).

Testes estatísticos

Os histogramas (Figuras 5,6 e 7) mostram a distribuição da frequência dos dados para cada medida e para cada espécie. Visualmente, os valores não apresentam desvios drásticos da normalidade. O teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* (Tabela 2) executado para cada medida e para cada espécie mostra que para a espécie *E. cristata* toda a amostra possui distribuição não-normal, enquanto *E. chiriquensis* é a espécie que possui mais variáveis normalmente distribuídas, apenas a altura do bico não possui distribuição normal. Em *E. flavogaster*, apenas o comprimento e altura do bico não possuem distribuição normal de acordo com esse teste. Diante desses resultados, optamos por usar as medidas transformadas para *log* nas análises subsequentes.

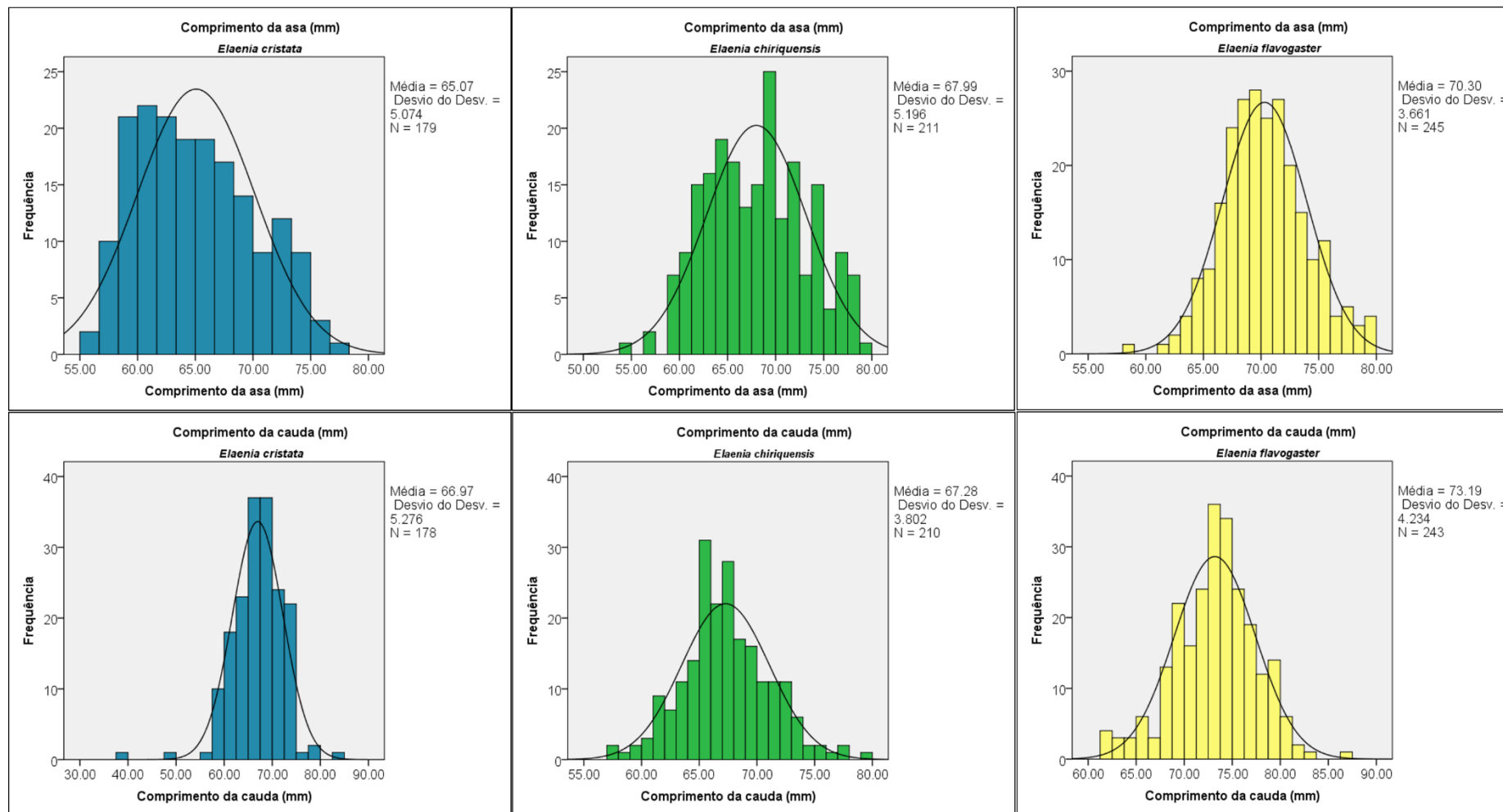


Figura 5. Histogramas da distribuição da frequência dos dados gerados pelo programa IBM SPSS para as medidas de comprimento da asa (linha superior) e comprimento da cauda (linha inferior) para as três espécies de *Elaenia* alvos deste estudo: *E. cristata* (azul), *E. chiriquensis* (verde) e *Elaenia flavogaster* (amarelo). Ao lado, são mostrados valores média, desvio e N amostral considerado na análise.

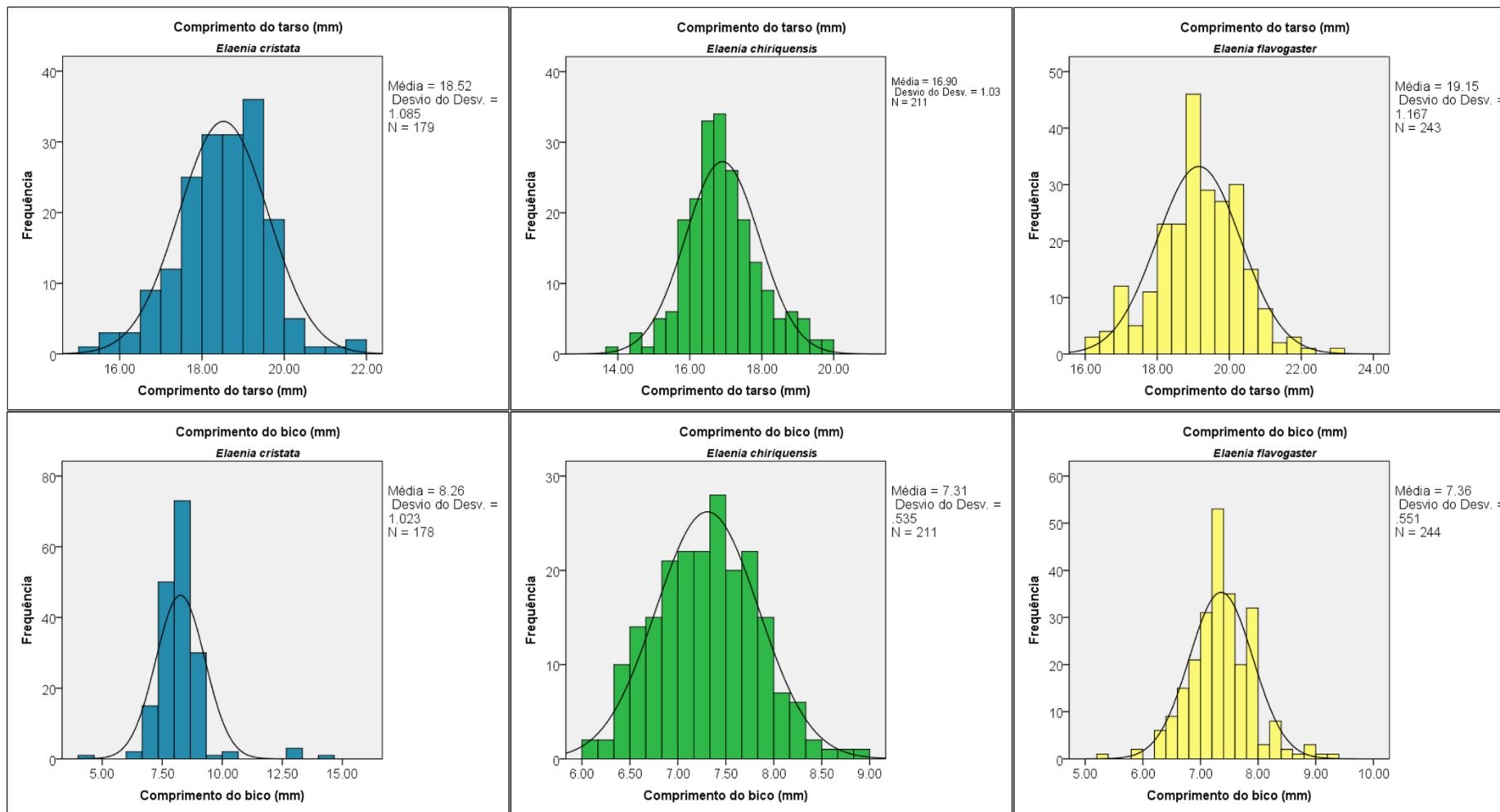


Figura 6. Histogramas da distribuição da frequência dos dados gerados pelo programa IBM SPSS para as medidas de comprimento do tarso (linha superior) e comprimento do bico (linha inferior) para as três espécies de *Elaenia* alvos deste estudo: *E. cristata* (azul), *E. chiriquensis* (verde) e *Elaenia flavogaster* (amarelo). Ao lado, são mostrados valores média, desvio e N amostral considerado na análise.

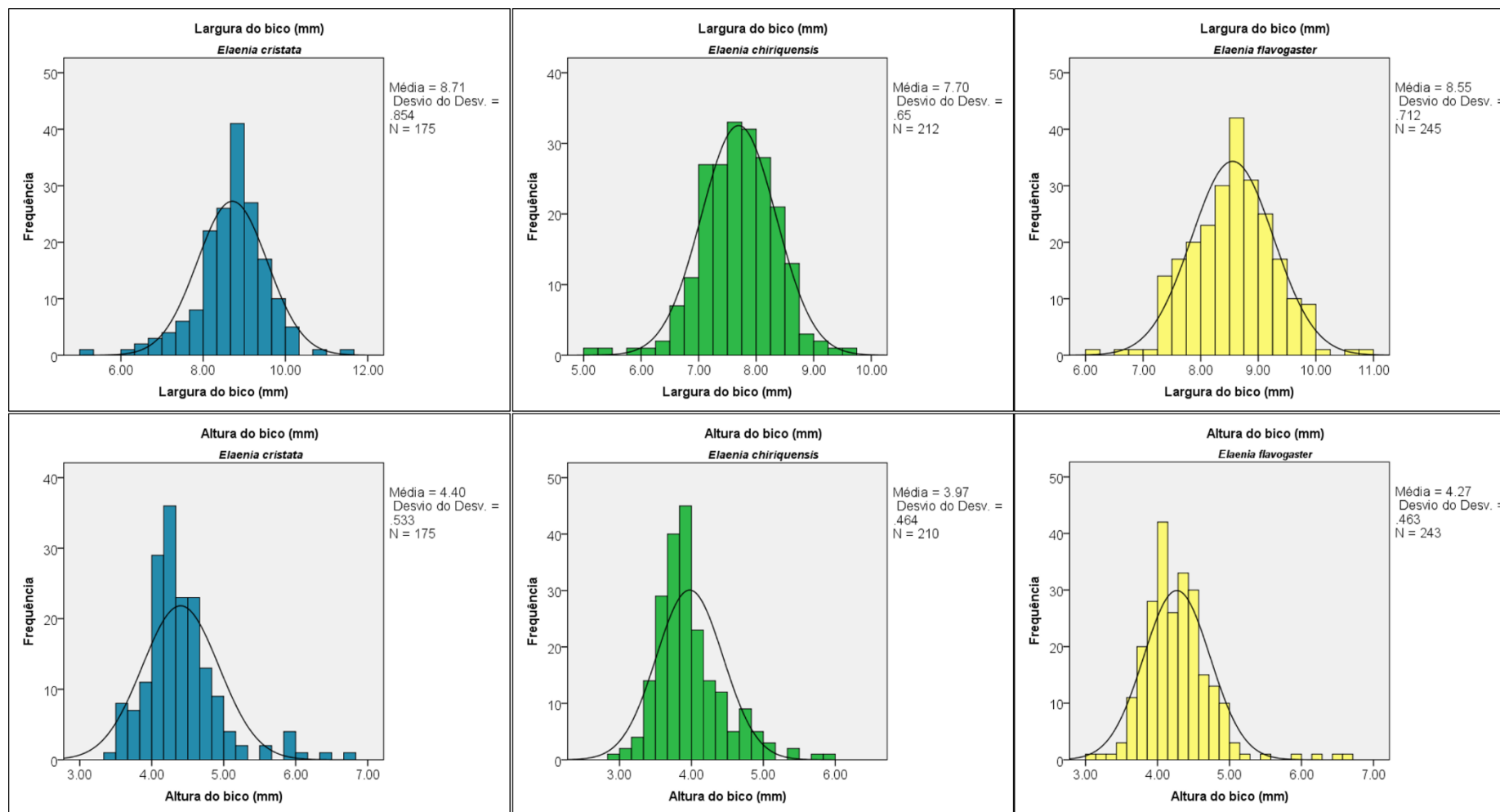


Figura 7. Histogramas da distribuição da frequência dos dados gerados pelo programa IBM SPSS para as medidas de largura do bico (linha superior) e altura do bico (linha inferior) para as três espécies de *Elaenia* alvos deste estudo: *E. cristata* (azul), *E. chiriquensis* (verde) e *Elaenia flavogaster* (amarelo). Ao lado, são mostrados valores média, desvio e N amostral considerado na análise.

Tabela 2. Resultados do teste de *Shapiro-Wilk* para verificação da normalidade dos dados morfométricos para cada medida e para cada espécie feito no programa IBM SPSS *statistics*.

Espécie	Medida	N	W	p
<i>Elaenia cristata</i>	Comprimento da asa (mm)	173	0,96	0,0001
	Comprimento da cauda (mm)	173	0,95	0,0001
	Comprimento do tarso (mm)	173	0,97	0,0029
	Comprimento do bico (mm)	173	0,92	0,0001
	Largura do bico (mm)	173	0,96	0,0001
	Altura do bico (mm)	173	0,89	0,0001
<i>Elaenia chiriquensis</i>	Comprimento da asa (mm)	206	0,98	0,0247
	Comprimento da cauda (mm)	206	0,99	0,4005
	Comprimento do tarso (mm)	206	0,98	0,0221
	Comprimento do bico (mm)	206	0,99	0,4106
	Largura do bico (mm)	206	0,98	0,0138
	Altura do bico (mm)	206	0,91	0,0001
<i>Elaenia flavogaster</i>	Comprimento da asa (mm)	238	0,99	0,5835
	Comprimento da cauda (mm)	238	0,99	0,1231
	Comprimento do tarso (mm)	238	0,99	0,1374
	Comprimento do bico (mm)	238	0,97	0,0004
	Largura do bico (mm)	238	0,99	0,6428
	Altura do bico (mm)	238	0,91	0,0001

N = número amostral utilizado na análise. W = valor do teste estatístico de *Shapiro-Wilk*. Significativo quando $p < 0,003$. Os valores significativos estão em negrito.

A análise de correlação entre as medidas mostrou que não há nenhuma variável altamente correlacionada que justificasse sua retirada das análises. A maior correlação encontrada é entre o comprimento da cauda e o comprimento da asa (0,47246).

Tabela 3. Matriz de correlação dos dados morfométricos gerada com o pacote MASS no programa R.

	Comp. asa	Comp. cauda	Comp. tarso	Largura do bico	Comp. do bico	Altura do bico
Comp. asa	1					
Comp. cauda	0,47246	1				
Comp. tarso	0,250196	0,469644	1			
Largura do bico	0,075242	0,167187	0,445378	1		
Comp. do bico	-0,07106	-0,09635	0,195346	0,238769	1	
Altura do bico	0,018192	0,115693	0,380825	0,266839	0,289725	1

Nesta análise, as medidas das três espécies alvos foram analisadas conjuntamente.

A análise de variância multivariada (MANOVA) para o traço de Pillai, $P_{2,614} = 0,938$, $p < 0,001$, mostrou que há diferença estatística significativa entre as três espécies alvo. A análise de variância (ANOVA) foi concordante com a análise anterior mostrando que existe diferença estatística significativa entre as espécies ($F_{2,614} = 147$, $p < 0,001$) (Anexo 6). O teste de *Tukey* para comparação das espécies par a par mostrou que há diferença estatística significativa entre *E. cristata* e *E. chiriquensis* ($p < 0,001$), *E. flavogaster* e *E. chiriquensis* ($p < 0,001$), mas que não há diferença estatística significativa entre *E. flavogaster* e *E. cristata* ($p > 0,001$) (Anexo 7).

A análise discriminante linear (LDA) mostrou que a proporção de rastreamento pela discriminante linear 1 (LD1) explica 58% da variação entre as espécies, enquanto a discriminante linear 2 (LD2) explica 42% dessa variação. Na análise dos valores individualmente por medida, o comprimento do tarso é a medida que mais contribui diretamente para a LD1 e o comprimento do bico é a que mais contribui para a LD2, mas de forma inversa (Tabela 4). E ainda, o tarso é a medida que melhor explica a separação

de *E. flavogaster* das outras duas espécies analisadas, enquanto o comprimento do bico é a medida que melhor explica a separação de *E. cristata* das outras duas espécies.

Tabela 4. Coeficientes discriminantes lineares (LD1 e LD2) para cada medida obtidos pela análise discriminante linear gerada no programa R entre as espécies *Elaenia cristata*, *Elaenia chiriquensis* e *Elaenia flavogaster*.

Medidas	LD1	LD2
Comprimento da asa	-0,3930481	0,474899
Comprimento da cauda	0,1242938	0,56137
Comprimento do tarso	1,0025508	0,279195
Comprimento do bico	0,1831702	-0,77486
Largura do bico	0,4823097	-0,11414
Altura do bico	0,129745	-0,08608

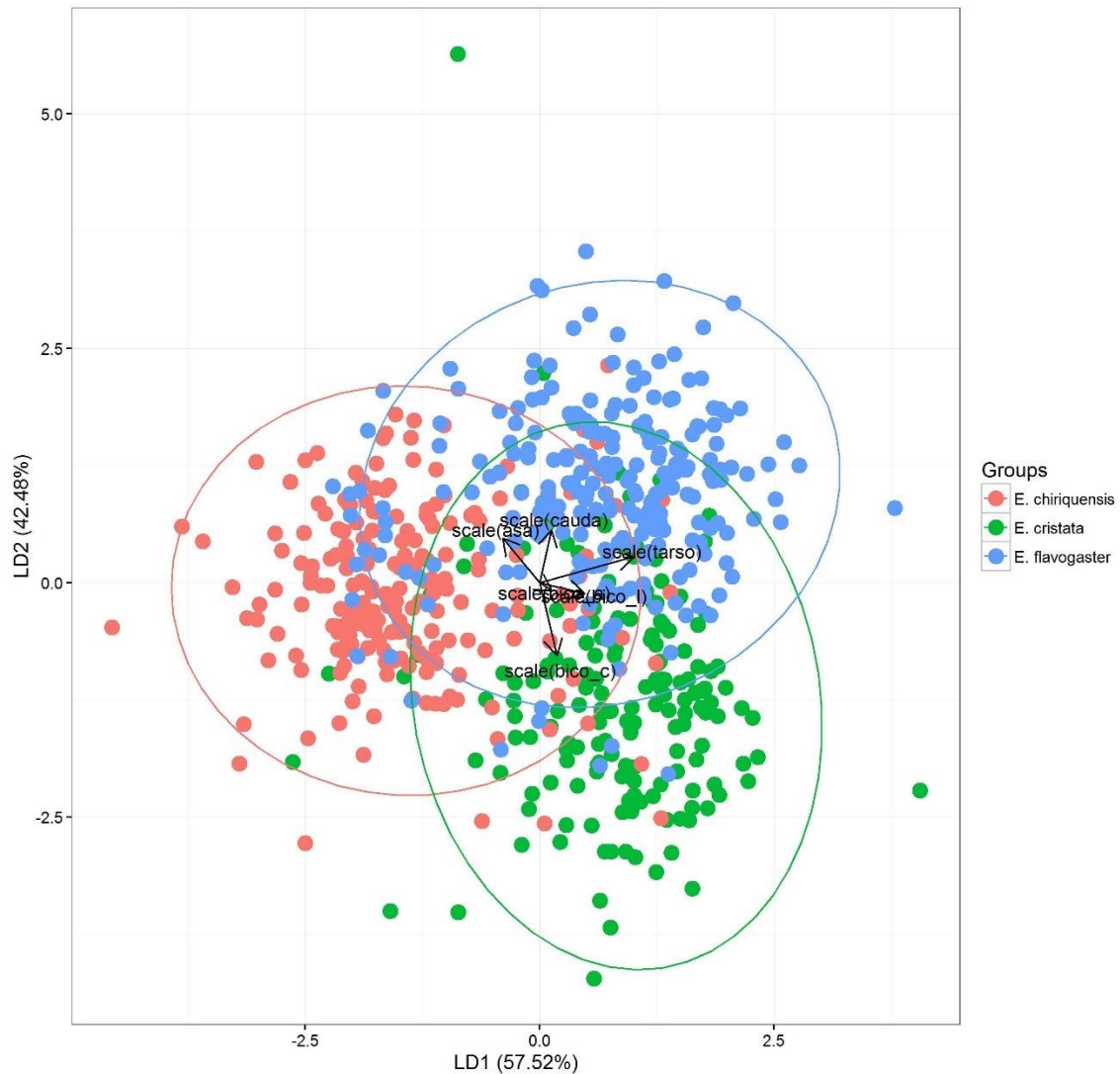


Figura 8. Representação da análise discriminante linear (LD1 e LD2) gerada para as espécies *Elaenia chiriquensis* (vermelho), *Elaenia cristata* (verde) e *Elaenia flavogaster* (azul) com base nas seis medidas morfológicas.

O modelo gerado para atribuição com base nas medidas da LDA foi validado e apresentou performance de 83% de atribuições corretas para a espécie *E. chiriquensis*, 81% para *E. flavogaster* e 76% para *E. cristata*. Esse modelo foi usado para prever à qual espécie seriam atribuídos os indivíduos que foram previamente retirados das análises por apresentarem discordância entre a informação genética (ver resultados filogenia) e a informação de identificação morfológica. Dos 18 indivíduos que apresentaram essa discordância, 11 foram testados usando o modelo, e a função *predict* atribuiu 10 destes à espécie *E. chiriquensis* e apenas 1 à espécie *E. flavogaster*, porém alguns indivíduos possuem chances similares de pertencerem a outras duas espécies (Tabela 5).

Tabela 5. Probabilidades a posterior (%) de atribuição para os indivíduos de *E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster* que apresentaram discordância, entre a identificação morfológica e o dado genético, com base no modelo linear discriminante

Nº de tobo/Espécie	Espécie atribuída pelo modelo (%)		
	<i>E. chiriquensis</i>	<i>E. cristata</i>	<i>E. flavogaster</i>
UFG3779 – <i>E. flavogaster</i>	95	0	5
UFG4049 – <i>E. flavogaster</i>	51	3	46
UFG3839 – <i>E. cristata</i>	44	20	36
UFG3444 – <i>E. flavogaster</i>	62	1	37
UFG4046 – <i>E. flavogaster</i>	86	10	4
UFG3771 – <i>E. cristata</i>	87	4	9
UFG3457 – <i>E. flavogaster</i>	94	1	5
UFG3450 – <i>E. flavogaster</i>	94	2	4
UFG3780 – <i>E. cristata</i>	84	6	11
UFG4232 – <i>E. flavogaster</i>	69	4	27
UFG2840- <i>E. flavogaster</i>	1	19	80

Nº de tobo da coleção LabGenBio e espécie identificada em campo. Espécies atribuídas pelo modelo e % de chance de atribuição à espécie. N = 11 indivíduos testados. Valores maiores que 80% em negrito.

Relações filogenéticas

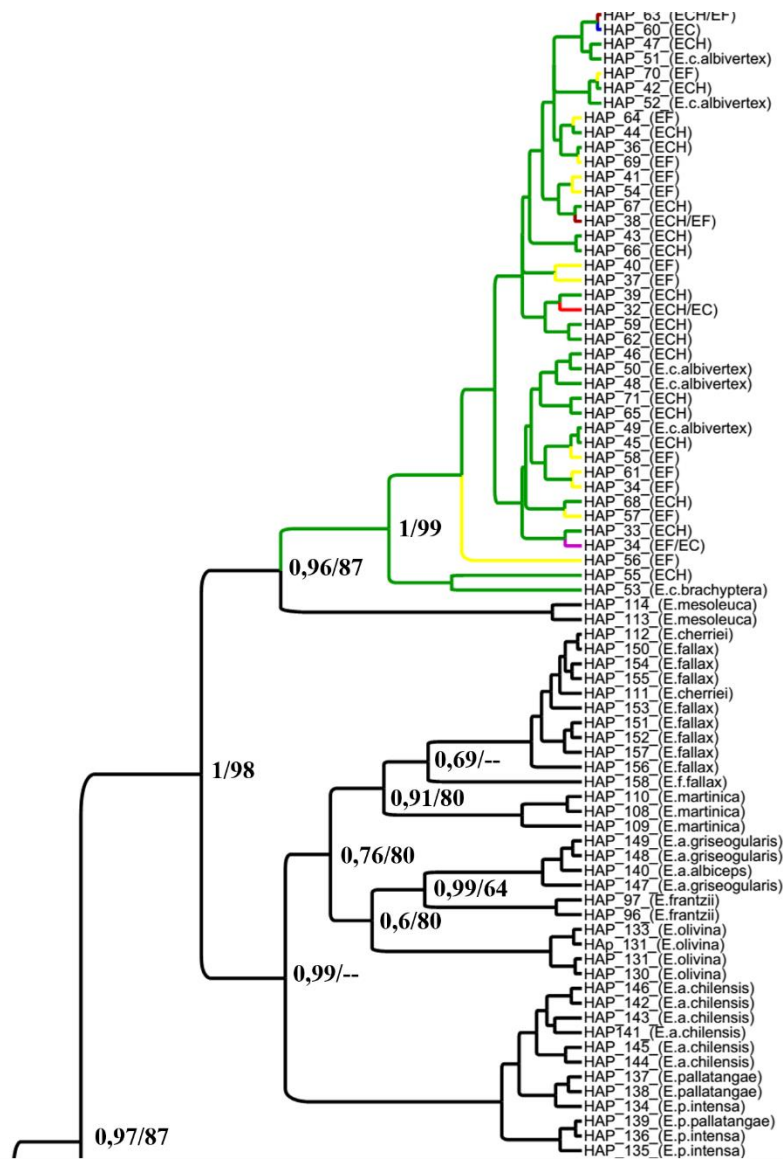
Dos 204 indivíduos capturados e amostrados em campo, cerca de 49% (N=99) foram amplificados e sequenciados neste estudo. Durante o processo de amplificação do gene ND2, alguns indivíduos (*E. cristata* = 9; *E. chiriquensis* = 1; *E. flavogaster* = 1) apresentaram uma banda inespecífica de menor tamanho, por volta de 600pb, não havendo padrão por localidade. Esses indivíduos foram retirados das análises pois não foi possível conseguir bom sequenciamento.

A MATRIZ1025 possui 49% de sítios variáveis (501/1025) e 57 sítios com variação única, enquanto a MATRIZ546 possui 45% de sítios variáveis (248/546) e 26 sítios com variação única. A MATRIZ1025 gerou 160 haplótipos enquanto a MATRIZ546 gerou 129 haplótipos. A diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica (Pi)

para *E. cristata* foi Hd = 0,833 e Pi = 0,009, para *E. chiriquensis* foi Hd= 0,818 e Pi = 0,015 e para *E. flavogaster* foi Hd = 0,993 e Pi = 0,016. A distância genética média entre *E. cristata* e *E. chiriquensis* foi de 0,156, *E. cristata* e *E. flavogaster* foi de 0,172 e entre *E. chiriquensis* e *E. flavogaster* foi de 0,129.

As árvores geradas pela ML (Anexo 8 e 9) recuperaram topologias semelhantes às geradas pela IB (Figura 9), apenas algumas diferenças nas relações entre espécies próximas, como, por exemplo, a espécie *E. cristata* pela IB é mostrada como espécie – irmã de *E. ruficeps*, enquanto pela ML, *E. ruficeps* está mais próxima das espécies *E. gigas*, *E. obscura* e *E. strepera*. Entretanto, não houve diferenças nos agrupamentos dentro das linhagens, ou seja, os haplótipos que compõem cada linhagem mantiveram-se independente da matriz ou método utilizado.

Dessa forma, a discussão segue com base na topologia obtida pela análise IB da MATRIZ1025. As três espécies de *Elaenia* alvos deste estudo (*E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster*) compõem linhagens evolutivas independentes (Figura 9), com valores moderados a altos de suporte estatístico (probabilidade *a posteriori* > 0,86 e *bootstrap* > 87). No entanto, em todas as topologias geradas, alguns indivíduos identificados em campo como sendo *E. cristata* (N = 3) e *E. flavogaster* (N = 16) agruparam no clado correspondente à linhagem de *E. chiriquensis* (Figuras 9 e 10). Nota-se também o compartilhamento de haplótipos por espécies diferentes, como o haplótipo HAP_34 (Figura 9), apesar de estar agrupado na linhagem que seria de *E. chiriquensis*, é compartilhado por um indivíduo da espécie *E. flavogaster* e outro da espécie *E. cristata*, e o haplótipo HAP_32, compartilhado por um indivíduo de *E. cristata* e um indivíduo de *E. chiriquensis*, os haplótipos HAP_38 e HAP_63, compartilhados por uma *E. chiriquensis* e uma *E. flavogaster* cada um. Não obtivemos nenhum indivíduo da espécie *E. chiriquensis* agrupada em outro clado.



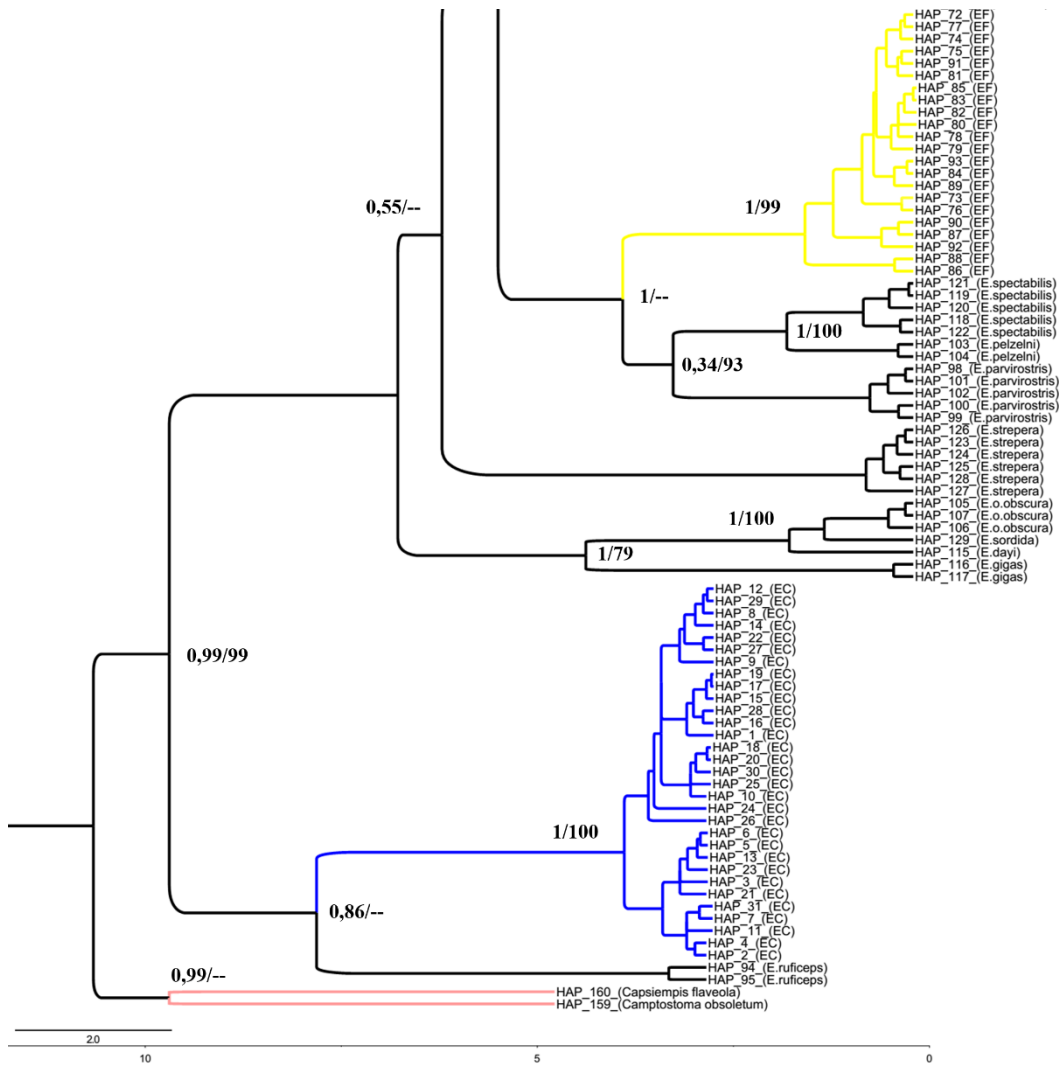


Figura 9. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana, gerada pelo programa BEAST V.1.8.2 utilizando a MATRIZ1025 de haplótipos para o gênero *Elaenia* e grupos externos para o gene mitocondrial ND2, com o modelo de evolução HKY, 20 milhões de gerações. Em destaque, os clados de interesse para este trabalho (Verde = *E. chiriquensis*, Amarelo = *E. flavogaster*, Azul = *E. cristata*, Rosa = grupo externo, Marrom = Haplótipo compartilhado por *E. chiriquensis*/*E. flavogaster*, Vermelho = Haplótipo compartilhado por *E. chiriquensis*/*E. cristata*, Roxo = Haplótipo compartilhado por *E. flavogaster*/*E. cristata*). A relação de indivíduos pertencentes aos haplótipos é encontrada no anexo 1. Nos nós das linhagens de interesse é mostrada a probabilidade *a posteriori*/bootstrap. A escala de tempo é mostrada abaixo da topologia.

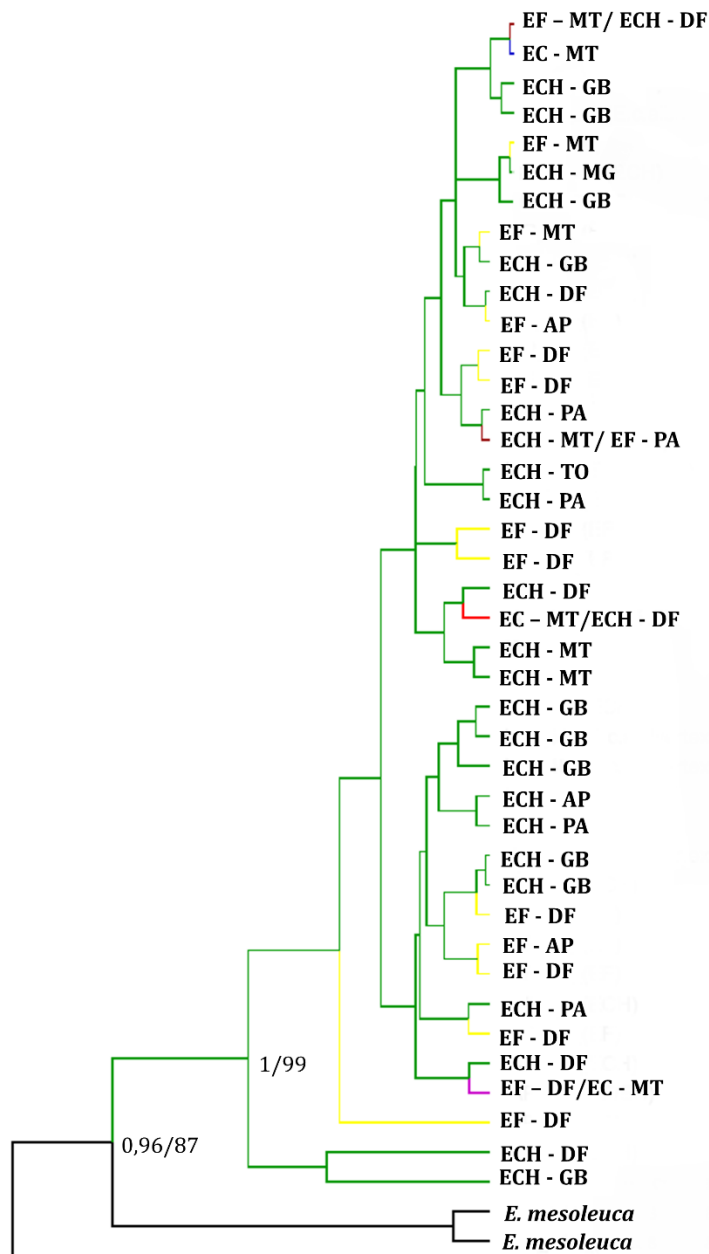


Figura 10. Detalhe da clado referente à espécie *E. chiriensis* retirado da árvore filogenética de Inferência Bayesiana, gerada pelo programa BEAST V.1.8.2, utilizando a MATRIZ1025 de haplótipos para o gênero *Elaenia* e grupos externos para o gene mitocondrial ND2. Verde = *E. chiriensis* - EC, Amarelo = *E. flavogaster* - EF, Azul = *E. cristata* - EC, Marrom = Haplótipo compartilhado por *E. chiriensis*/*E. flavogaster*, Vermelho = Haplótipo compartilhado por *E. chiriensis*/*E. cristata*, Roxo = Haplótipo compartilhado por *E. flavogaster*/*E. cristata*, GB = sequências do *Genbank*, siglas dos estados de coletas. No nó é mostrada a probabilidade *a posteriori*/ *bootstrap*.

A topologia gerada por IB mostra que a divergência da linhagem das espécies-irmãs para *E. cristata* ocorreu há aproximadamente 7,82 milhões de anos, enquanto *E. flavogaster* há 3,91 milhões de anos e a mais recente, *E. chiriquensis*, possivelmente há 3,39 milhões de anos (Figura 11).

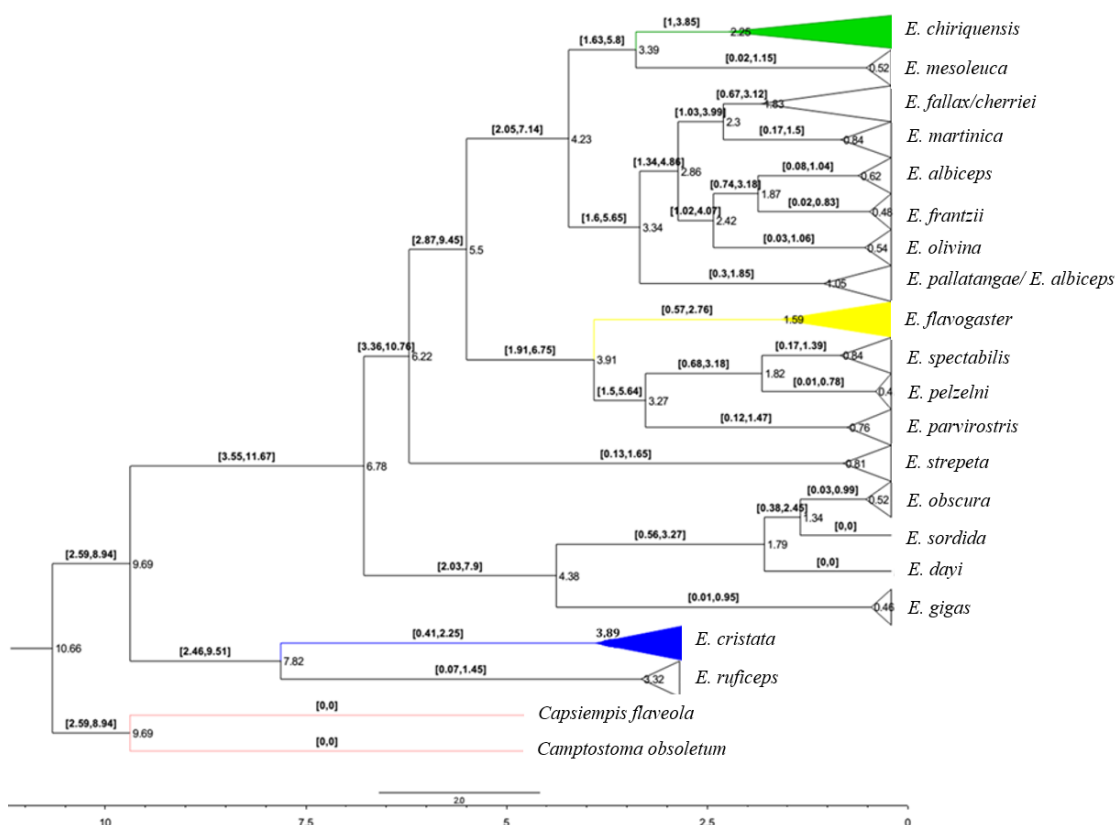


Figura 11. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana gerada pelo programa BEAST V.1.8.2 utilizando a MATRIZ1025 para o gênero *Elaenia* e grupos externos para o gene mitocondrial ND2. Em destaque os clados de interesse para este trabalho (Verde = *E. chiriquensis*, Amarelo = *E. flavogaster*, Azul = *E. cristata* e Rosa = grupo externo). Nos nós é mostrado o tempo de divergência entre as linhagens. Nos clados é mostrado o valor de erro em 95% HPD. Os terminais foram colapsados para melhor visualização das relações. Escala em milhões de anos.

Sexagem Molecular

Todos aqueles indivíduos que agruparam no clado correspondente à linhagem de *E. chiriquensis* (N = 36, Figura 10), assim como 31 indivíduos escolhidos ao acaso que agruparam no clado de *E. cristata* (N = 17) e no de *E. flavogaster*. (N = 14) foram sexados. Os resultados obtidos pela sexagem molecular são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Indivíduos sexados molecularmente para as espécies *E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster*. Os clados referem-se às linhagens mostrados na figura 9.

Clado <i>E. chiriquensis</i>			
Espécie	Sexo	N	Porcentagem de machos
<i>E. chiriquensis</i>	Machos	11	64%
	Fêmeas	6	
<i>E. cristata</i>	Machos	3	100%
	Fêmeas	0	
<i>E. flavogaster</i>	Machos	13	81%
	Fêmeas	3	
Clado <i>E. flavogaster</i>			
Espécie	Sexo	N	Porcentagem de machos
<i>E. flavogaster</i>	Machos	9	64%
	Fêmeas	5	
Clado <i>E. cristata</i>			
Espécie	Sexo	N	Porcentagem de machos
<i>E. cristata</i>	Machos	12	70%
	Fêmeas	5	

DISCUSSÃO

Morfometria

Os resultados das análises morfométricas mostram que, quando utilizadas em conjunto, as seis medidas mostram-se eficazes na distinção entre as três espécies analisadas. A diferença estatística significativa quando a espécie *E. chiriquensis* é comparada às outras duas espécies, para as medidas específicas deste estudo, é concordante com dados na literatura em relação ao tamanho total das espécies, pois, segundo Hosner (2016), para o comprimento total, *E. chiriquensis* (13,5 cm) é a menor das três espécies, sendo *E. cristata* (14,5 cm) uma intermediária e *E. flavogaster* (16-17 cm) a maior das três.

Mesmo não havendo diferença estatística significativa que separe as espécies *E. cristata* de *E. flavogaster*, segundo resultados do Teste de Tukey, na figura 8, é possível ver a existência de três grupos ainda que com alguma sobreposição. E ainda, as duas

espécies com melhor grau de separação são *E. flavogaster*, com a maior contribuição do comprimento do tarso, e *E. cristata* pelo comprimento do bico.

A construção de um modelo estatístico validado, com performance de acerto superior à 75% para distinção das espécies, é de grande ajuda quando há dúvidas, por exemplo, quanto à classificação apenas por caracteres subjetivos, como a plumagem, em espécies com alto grau de semelhança. Outra aplicação dos modelos discriminantes foi o uso para sexagem de *Puffinus mauretanicus*, uma ave marinha, com um modelo com 90% de acurácia para as atribuições de sexo (Genovart *et al.*, 2003). Cueto *et al.* (2015) também utilizou a análise discriminante linear com medidas morfométricas como uma alternativa à sexagem molecular da espécie *E. albiceps chilensis*, melhor explicado abaixo.

Análises filogenéticas

As análises filogenéticas mostram que as três espécies-alvo deste estudo formam linhagens independentes. Contudo, em relação ao clado correspondente à espécie *E. chiriquensis* (Figura 10), encontramos algumas divergências entre a identificação de espécie em campo e as relações filogenéticas baseadas no gene mitocondrial ND2. Casos de polifiletismo já foram relatados para esse gênero, porém não para essas espécies. Rheindt, Christidis, *et al.* (2008) identificaram polifiletismo para as subespécies de *E. pallatangae* e *E. albiceps*, que posteriormente foi melhor estudado em outro trabalho de Rheindt *et al.* (2009), sugerindo que esses resultados na filogenia devem-se a fatores múltiplos como problemas na identificação, separação incompleta das linhagens e momentos de hibridação/introgressão que podem ter ocorrido entre as espécies no final do Pleistoceno.

É possível que as divergências morfológicas e genéticas observadas entre as espécies alvo deste estudo sejam ocasionadas por erros de identificação. Os indivíduos foram identificados em campo de acordo com a plumagem e principalmente seguindo a descrição de Hosner (2016), com a presença ou ausência de crista, e presença ou ausência de coloração branca na região da crista. Há a possibilidade de ocorrer erros de identificação quando se trabalha com espécies com elevado grau de semelhança (como descrito na introdução) e quando são usados caracteres subjetivos, como o tamanho da crista. Por exemplo, em nosso conjunto de dados, encontramos 16 indivíduos que foram identificados em campo como a espécie *E. flavogaster*, mas na análise filogenética, esses

indivíduos estão associados à linhagem de *E. chiriquensis*. Como a distinção entre estas duas espécies em campo é feita basicamente pelo tamanho da crista, já que teoricamente as duas apresentariam coloração similar, algumas interpretações errôneas do tamanho da crista podem explicar essas relações duvidosas.

Rheindt, Norman, *et al.* (2008a) também encontraram em outro gênero de tiranídeos, *Zimmerius*, discordância entre os dados moleculares e vocais quando comparados com a taxonomia feita com base na plumagem. Eles sugerem que a vocalização seja um melhor indicador de diferenciação entre espécies do que os padrões de plumagem, levantando a hipótese de que a plumagem em tiranídeos seja um caractere conservado. Dessa forma, é possível que os caracteres diagnósticos empregados não sejam os mais indicados para o reconhecimento entre essas espécies.

A ocorrência de híbridos também pode ser uma possível explicação para as divergências entre identificação em campo e análises filogenéticas observadas nas espécies deste estudo. Usando nosso modelo de atribuição morfométrico para os indivíduos em questão, temos que alguns possuem chances similares de serem atribuídos à uma espécie ou outra (Tabela 5). Por exemplo, o espécime UFG4049 identificado em campo como *E. flavogaster*, segundo o modelo de atribuição, possui 51% de chance de ser uma *E. chiriquensis* e 46% de chance de ser uma *E. flavogaster*. Observamos, ainda, que na filogenia esse encontra-se na linhagem correspondente à *E. chiriquensis*. Essa situação se repete para mais quatro indivíduos. Os casos de polifiletismo em tiranídeos já foram relatados, por exemplo, em Tello *et al.* (2007) e também no gênero *Elaenia* por Rheindt *et al.* (2009), nesse último com possível ocorrência de híbridos.

Nossas análises filogenéticas utilizaram maior número amostral dessas três espécies e maior amplitude geográfica do que o estudo anterior para a filogenia do gênero (Rheindt, Christidis, *et al.*, 2008). Assim, é possível que com o maior volume de dados em nosso caso, as relações mais complexas entre as espécies, como os erros de identificação ou híbridos, tenham sido reveladas. Uma alternativa para testar essa hipótese da ocorrência de híbridos seria investigar com o uso de outros marcadores, por exemplo, os nucleares, que caso sejam híbridos poderiam evidenciar eventuais sinais filogenéticos das duas linhagens parentais, buscando melhor resolução para esses indivíduos em questão.

As espécies de *Elaenia* alvos deste estudo não apresentam dimorfismo sexual descrito. Contudo, Cueto *et al.* (2015) encontraram diferenças morfométricas entre machos e fêmeas para outra espécie congênera, a *Elaenia albiceps chilensis*. Baseado

nisso, optamos por fazer a sexagem molecular de alguns indivíduos e não encontramos evidências claras que exista dimorfismo sexual nas espécies alvo deste estudo. Com nossos resultados, o que podemos dizer é que há uma maior tendência à captura de machos para as três espécies, porém isso não descarta completamente a hipótese de que indivíduos machos de *E. chiriquensis* maiores que a média estejam sendo identificados como *E. flavogaster*. Desta forma, ainda são necessários mais estudos para melhor esclarecimento da hipótese de dimorfismo sexual nas espécies alvo deste estudo, como por exemplo, análise morfométrica como proposto por Cueto *et al.* (2015).

Divergência das linhagens

As datas de divergência entre as linhagens de *E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster* (Figura 11) neste estudo são próximas das encontradas por Rheindt, Christidis, *et al.* (2008) ao construírem a filogenia do gênero *Elaenia*, utilizando o marcador mitocondrial ND2 e também marcador nuclear – FIB5. A diferença de datas encontrada pode ser devido à diferentes taxas utilizadas por nós e o estudo anterior.

Para (Rheindt, Christidis, *et al.* (2008)), as primeiras divergências ocorreram de forma rápida a partir do final do Mioceno (entre 8,5 a 5,3 milhões de anos), períodos concordantes aos obtidos em nossa datação, seguidos de eventos de diversificação no início do Plioceno.

CONCLUSÕES

Existe diferenciação entre as três espécies de *Elaenia* estudadas com base nas análises morfométricas.

É possível o uso de modelo de predição/atribuição para identificação de espécie com base em morfometria e performance correta de 83% para a espécie *E. chiriquensis*, 81% para *E. flavogaster* e 76% para *E. cristata*.

De acordo com as análises filogenéticas, as três espécies constituem linhagens bem definidas, mas com alguns casos de divergência entre a identificação morfológica e os dados moleculares para o gene mitocondrial ND2. Essas divergências podem ser atribuídas a fatores como ocorrência de híbridos, erros de identificação e possível existência de dimorfismo sexual.

A estimativa de tempo de divergência das linhagens, gerada por IB mostra que a separação de *E. cristata* das espécies-irmãs ocorreu há aproximadamente 7,82 milhões de

anos, enquanto *E. flavogaster* há 3,91 milhões de anos e a mais recente *E. chiriquensis* possivelmente há 3,39 milhões de anos, sendo essas linhagens bem definidas.

BIBLIOGRAFIA

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, n. 6, p. 716-723, 1974.

AVISE, J. C. *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 489-522, 1987.

BIRDSLEY, J. S. Phylogeny of the tyrant flycatchers (Tyrannidae) based on morphology and behavior. **The Auk**, v. 119, n. 3, p. 715-734, 2002.

BRIAN RIPLEY *et al.* **Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS**: CRAN, 2015.

BRUFORD, M. W. *et al.* Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: (Ed.). **Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach**, 1992. cap. 468, p.225-269. ISBN 0199632774.

CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B. **Biologia**. 8ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1464 p. ISBN 978-85-363-2269-8.

CHAVES, A. V. *et al.* Molecular taxonomy of Brazilian tyrant-flycatchers (Passeriformes: Tyrannidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 6, p. 1169-1177, 2008.

CICERO, C.; JOHNSON, N. K. Phylogeny and character evolution in the Empidonax group of tyrant flycatchers (Aves: Tyrannidae): a test of W. E. Lanyon's hypothesis using mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 22, n. 2, p. 289-302, 2002.

CLARAMUNT, S.; CRACRAFT, J. A new time tree reveals Earth history's imprint on the evolution of modern birds. **Science Advances**, v. 1, n. 11, p. 1-13, 2015.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ONITOLÓGICOS. Listas das aves do Brasil. 2014. Disponível em: < www.cbro.org.br >. Acesso em: 26 de dezembro de 2015.

CUETO, V. R. *et al.* Sex determination by morphometry of adult White-crested Elaenia (*Elaenia albiceps chilensis*). **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 23, n. 1, p. 18-24, 2015.

DARRIBA, D. *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012. ISSN 1548-7091.

DE PAIVA, L. V.; MARINI, M. Â. Timing of Migration and Breeding of the Lesser Elaenia (*Elaenia chiriquensis*) in a Neotropical Savanna. **The Wilson Journal of Ornithology**, v. 125, n. 1, p. 116-120, 2013.

DEL HOYO, J. *et al.* Handbook of the Birds of the World Alive. **Family Tyrannidae**, Edicions, Barcelona, 2015. Disponível em: < <http://www.hbw.com/> >. Acesso em: 20 de novembro de 2015.

DRUMMOND, A. J. *et al.* Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969-1973, 2012. ISSN 0737-4038.

ERICSON, P. G. *et al.* Higher-level phylogeny and morphological evolution of tyrant flycatchers, cotingas, manakins, and their allies (Aves: Tyrannida). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 2, p. 471-483, 2006.

FITZPATRICK, J. Tyrant-flycatchers (Tyrannidae). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A., *et al.* (Ed.). **Handbook of the Birds of the World Alive**. Barcelona: Lynx Ediciones, 2015.

FRANKHAN, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Brasil: Editora Sociedade Brasileira de Genética, 2006. 259 ISBN 9788589265089.

FRIDOLFSSON, A.-K.; ELLEGREN, H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. **Journal of avian biology**, p. 116-121, 1999.

GENOVART, M.; MCMINN, M.; BOWLER, D. A discriminant function for predicting sex in the Balearic Shearwater. **Waterbirds**, v. 26, n. 1, p. 72-76, 2003. ISSN 1524-4695.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: Nucleic acids symposium series, 1999. p.95-98.

HOSNER, P. Genus Elaenia. In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A., *et al.* (Ed.). **Handbook of the Birds of the World Alive**. Barcelona: Lynx Ediciones, v.9, 2016.

IBM SPSS Statistics for Windows. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2013.

IRESTEDT, M. *et al.* Nuclear DNA from old collections of avian study skins reveals the evolutionary history of the Old World suboscines (Aves, Passeriformes). **Zoologica Scripta**, v. 35, n. 6, p. 567-580, 2006.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. 2015. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org> >. Acesso em: 23 de dezembro de 2015.

JARVIS, E. D. *et al.* Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. **Science**, v. 346, n. 6215, p. 1320-1331, 2014.

KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012. ISSN 1367-4803.

KERR, K. C. R. *et al.* Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 535-543, 2007.

LANYON, W. E. A phylogeny of the thirty-two genera in the Elaenia assemblage of tyrant flycatchers. **American Museum Novitates**, p. 1-57, 1988.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009. ISSN 1367-4803.

MARINI, M. Â. *et al.* Breeding biology of birds in the Cerrado of Central Brazil. **Ornitologia Neotropical**, v. 23, p. 385-405, 2012.

MARINI, M. Â. *et al.* Biologia reprodutiva de Elaenia cristata (Aves: Tyrannidae) em cerrado do Brasil Central. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, n. 1, p. 3-12, 2009.

MCCORMACK, J. E. *et al.* A phylogeny of birds based on over 1,500 loci collected by target enrichment and high-throughput sequencing. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54848, 2013.

PACHECO, M. A. *et al.* Evolution of modern birds revealed by mitogenomics: timing the radiation and origin of major orders. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 6, p. 1927-1942, 2011. ISSN 0737-4038.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2015.

RAMBAUT, A. *et al.* **Tracer v1.6** 2014.

RHEINDT, F. E.; CHRISTIDIS, L.; NORMAN, J. A. Habitat shifts in the evolutionary history of a Neotropical flycatcher lineage from forest and open landscapes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 193, 2008.

RHEINDT, F. E.; CHRISTIDIS, L.; NORMAN, J. A. Genetic introgression, incomplete lineage sorting and faulty taxonomy create multiple cases of polyphyly in a montane clade of tyrant-flycatchers (Elaenia, Tyrannidae). **Zoologica Scripta**, v. 38, n. 2, p. 143-153, 2009.

RHEINDT, F. E. *et al.* Cryptic speciation in the Lesser Elaenia *Elaenia chiriquensis* (Aves: Passeriformes: Tyrannidae). **Zootaxa**, v. 4032, n. 3, p. 251-263, 2015.

RHEINDT, F. E.; NORMAN, J. A.; CHRISTIDIS, L. DNA evidence shows vocalizations to be a better indicator of taxonomic limits than plumage patterns in *Zimmerius* tyrant-flycatchers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 1, p. 150-156, 2008a.

RHEINDT, F. E.; NORMAN, J. A.; CHRISTIDIS, L. Phylogenetic relationships of tyrant-flycatchers (Aves: Tyrannidae), with an emphasis on the elaeniine assemblage. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 46, n. 1, p. 88-101, 2008b.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912 p. ISBN 85-209-0816-0.

SORENSEN, M. D. *et al.* Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 105-114, 1999. ISSN 1055-7903.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013. ISSN 0737-4038.

TELLO, J. G.; BATES, J. M.; JOHNSON, K. Molecular phylogenetics of the tody-tyrant and flatbill assemblage of tyrant flycatchers (Tyrannidae). **The Auk**, v. 124, n. 1, p. 134-154, 2007.

THOMPSON, J. D. *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997. ISSN 0305-1048.

ANEXOS

Anexo 1. Informações sobre as amostras utilizadas nesta pesquisa para as análises filogenéticas. Sequências retiradas do banco de dados *GenBank* possuem número de acesso, sequências geradas por nós constam na coluna *Voucher* o número de tombo dessa amostra na coleção do LabGenBio. O local de coleta, para nossas amostras e para as retiradas do *GenBank*, quando disponível. As colunas haplótipos MATRIZ1025 e MATRIZ546 correspondem a qual haplótipo cada amostra pertence dependendo da matriz analisada. A coluna análise morfometria refere-se à se determinada amostra também foi usada nas análises da morfometria ou não.

Espécie	Voucher	Nº de acesso <i>Genbank</i>	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Camptostoma obsoletum</i>	-	EU330878	-	HAP_159	HAP_128	N
<i>Capsiempis flaveola</i>	-	DQ294563	-	HAP_160	Hap_129	N
<i>Elaenia albiceps albiceps</i>	-	EU311172	Bolívia: La Paz, Bautista Savaedra	HAP_140	HAP_114	N
<i>Elaenia albiceps chilensis</i>	-	EU311054	Peru: Cusco	HAP_141	HAP_115	N
<i>Elaenia albiceps chilensis</i>	-	EU311170	Peru: San Martin, 20 km NE Tarapoto towards Yurimaguas	HAP_144	HAP_118	N
<i>Elaenia albiceps chilensis</i>	-	EU311180	Peru: Loreto, 7 km SW Jeberos	HAP_145	HAP_119	N
<i>Elaenia albiceps chilensis</i>	-	EU311181	Peru: Piura, KM 34 on Olmos-Bagua Chica Highway	HAP_146	HAP_110	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia albiceps chilensis</i>	-	EU311185	Chile: Metropolitana, Chacabuco, 4 km SSW from peak of Cerro El Roble, 1660 m	HAP_142	HAP_116	N
<i>Elaenia albiceps chilensis</i>	-	EU311187	Bolívia: Chuquisaca, Tarabuco	HAP_143	HAP_117	N
<i>Elaenia albiceps griseogularis</i>	-	EU311179	Equador: Carchi, 3 km SE Impueran, Cerro Mondragon	HAP_148	HAP_121	N
<i>Elaenia albiceps griseogularis</i>	-	EU311188	Equador: Loja: Utuana	HAP_149	HAP_114	N
<i>Elaenia albiceps griseogularis</i>	-	EU311190	Peru: Cajamarca, Llama-Huambos	HAP_147	HAP_120	N
<i>Elaenia cherriei</i>	-	EU311050	Rep. Dominicana, Independencia, Sierra de Neiba	HAP_112	HAP_91	N
<i>Elaenia cherriei</i>	-	EU311089	Rep. Dominicana	HAP_111	HAP_90	N
<i>Elaenia chiriquensis</i>	-	AY115465	Brasil: Amapá: Tartarugalzinho, Lago Cujubim.	HAP_44	HAP_34	N
<i>Elaenia chiriquensis</i>	-	AY115466	Brasil: Amapá: Tartarugalzinho, Lago Cujubim.	HAP_45	HAP_35	N
<i>Elaenia chiriquensis</i>	-	AY115467	Brasil: Amapá: Tartarugalzinho, Lago Cujubim.	HAP_46	HAP_36	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia chiriquensis</i>	-	AY115468	Bolívia: Santa Cruz: Velasco, Parque Nacional Noel Kempff Mercado	HAP_44	HAP_34	N
<i>Elaenia chiriquensis</i>	-	DQ294543	Brasil: Amapá: Tartarugalzinho, Lago Cujubim	HAP_47	HAP_34	N
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG2679	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_33	HAP_23	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG2683	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_55	HAP_42	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG2684	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_32	HAP_22	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG2685	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_36	HAP_26	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG2688	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_39	HAP_29	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG3194	-	Parque Nacional Grande Sertão Veredas - MG	HAP_42	HAP_32	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG3318	-	Ponte Alta do Tocantins - TO	HAP_43	HAP_33	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG3615	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_59	HAP_46	N
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG3616	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_62	HAP_49	N
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG3619	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_32	HAP_22	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG3652	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_38	HAP_28	N
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG3705	-	Estação Ecológica de Águas Emendadas - DF	HAP_63	HAP_50	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG4013	-	Fazenda Experimental da Embrapa - AP	HAP_71	HAP_55	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG4221	-	Salvaterra PA 154 Km 5, Ilha do Marajó - PA	HAP_65	HAP_33	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG4226	-	Salvaterra PA 154 Km 5, Ilha do Marajó - PA	HAP_66	HAP_24	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG4229	-	Salvaterra PA 154 Km 5, Ilha do Marajó - PA	HAP_67	HAP_52	S
<i>Elaenia chiriquensis</i>	UFG4230	-	Salvaterra PA 154 Km 5, Ilha do Marajó - PA	HAP_68	HAP_53	S
<i>Elaenia chiriquensis albivertex</i>	-	EU310943	-	HAP_50	HAP_38	N
<i>Elaenia chiriquensis albivertex</i>	-	EU310946	-	HAP_48	HAP_37	N
<i>Elaenia chiriquensis albivertex</i>	-	EU310947	-	HAP_49	HAP_35	N
<i>Elaenia chiriquensis albivertex</i>	-	EU310948	-	HAP_51	HAP_34	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia chiriquensis albivertex</i>	-	EU310949	-	HAP_52	HAP_39	N
<i>Elaenia chiriquensis brachyptera</i>	-	EU310951	-	HAP_53	HAP_40	N
<i>Elaenia cristata</i>	-	EU311067	Bolívia: Sta Cruz, Serrania de Huanchaca, 21 km SE Catarata Arco Iris	HAP_31	HAP_4	N
<i>Elaenia cristata</i>	-	EU311090	Brasil: Pará	HAP_30	HAP_21	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2455	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_1	HAP_1	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2468	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_2	HAP_2	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2472	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2473	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_4	HAP_4	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2627	-	Parque Nacional das Emas - GO	HAP_5	HAP_4	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2629	-	Parque Nacional das Emas - GO	HAP_6	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2652	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_3	HAP_3	S

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2658	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_7	HAP_5	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2665	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2671	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG2815	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_8	HAP_6	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3022	-	Nova Xavantina - MT	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3024	-	Nova Xavantina - MT	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3092	-	Parque Nacional Grande Sertão Veredas - MG	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3138	-	Parque Nacional Grande Sertão Veredas - MG	HAP_9	HAP_7	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3141	-	Parque Nacional Grande Sertão Veredas - MG	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3162	-	Parque Nacional Grande Sertão Veredas - MG	HAP_10	HAP_8	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3172	-	Parque Nacional Grande Sertão Veredas - MG	HAP_18	HAP_15	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3176	-	Parque Nacional Grande Sertão Veredas - MG	HAP_20	HAP_16	S

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3187	-	Parque Nacional Grande Sertão Veredas - MG	HAP_10	HAP_8	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3322	-	Ponte Alta do Tocantins - TO	HAP_11	HAP_9	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3332	-	Ponte Alta do Tocantins - TO	HAP_12	HAP_10	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3617	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_1	HAP_1	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3618	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_17	HAP_14	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3624	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_13	HAP_5	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3625	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_14	HAP_11	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3626	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_3	HAP_3	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3630	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_15	HAP_12	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3632	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_16	HAP_13	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3634	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_19	HAP_8	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3687	-	Estação Ecológica de Águas Emendadas - DF	HAP_21	HAP_3	S

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3688	-	Estação Ecológica de Águas Emendadas - DF	HAP_10	HAP_8	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3716	-	Estação Ecológica de Águas Emendadas - DF	HAP_29	HAP_20	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3754	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_73	HAP_57	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3771	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_32	HAP_22	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3778	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3780	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_34	HAP_24	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3781	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_22	HAP_8	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3782	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_23	HAP_17	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3783	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_24	HAP_18	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3839	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_60	HAP_47	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3842	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG3843	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_27	HAP_8	S

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4045	-	Fazenda Experimental da Embrapa - AP	HAP_26	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4061	-	Fazenda Experimental da Embrapa - AP	HAP_10	HAP_8	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4199	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_28	HAP_14	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4202	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_3	HAP_3	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4203	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_10	HAP_8	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4207	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_10	HAP_8	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4208	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_10	HAP_8	N
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4213	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_25	HAP_19	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4218	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_10	HAP_8	S
<i>Elaenia cristata</i>	UFG4231	-	Salvaterra PA 154 Km 5, Ilha do Marajó - PA	HAP_10	HAP_8	S
<i>Elaenia dayi</i>	-	EU311094	Venezuela: Bolivar, Auyan Tepui, Camp V	HAP_115	HAP_94	N
<i>Elaenia fallax</i>	-	JN568681	-	HAP_150	HAP_122	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia fallax</i>	-	JN568682	-	HAP_151	HAP_123	N
<i>Elaenia fallax</i>	-	JN568683	-	HAP_152	HAP_123	N
<i>Elaenia fallax</i>	-	JN568684	-	HAP_153	HAP_124	N
<i>Elaenia fallax</i>	-	JN568685	-	HAP_154	HAP_122	N
<i>Elaenia fallax</i>	-	JN568686	-	HAP_155	HAP_122	N
<i>Elaenia fallax</i>	-	JN568687	-	HAP_156	HAP_125	N
<i>Elaenia fallax</i>	-	JN568688	-	HAP_157	HAP_126	N
<i>Elaenia fallax fallax</i>	-	EU311052	Jamaica	HAP_158	HAP_127	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	EF501906	-	HAP_91	HAP_73	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	EU311047	Trinidad & Tobago: Tobago	HAP_90	HAP_72	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	EU311060	Guyana	HAP_87	HAP_69	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	EU311070	Brasil: Amapá	HAP_89	HAP_71	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	EU311082	Costa rica	HAP_88	HAP_70	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	EU311091	St. Vincent	HAP_92	HAP_74	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	EU311093	Panamá	HAP_86	HAP_68	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	EU311103	Brasil: Pará, Belém	HAP_93	HAP_75	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	KF228505	Concepción, Paraguai	HAP_85	HAP_67	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG2449	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_40	HAP_30	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG2681	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_34	HAP_24	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG2682	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_35	HAP_25	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG2687	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_37	HAP_27	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG2690	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_41	HAP_31	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3444	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_54	HAP_41	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3450	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_56	HAP_43	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3455	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_57	HAP_44	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3457	-	APA Gama Cabeça de Veado - DF	HAP_58	HAP_45	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3633	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_80	HAP_61	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3644	-	Parque Nacional Chapada dos Guimarães - MT	HAP_72	HAP_56	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3755	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_74	HAP_58	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3756	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_76	HAP_57	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3775	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_64	HAP_51	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3779	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_70	HAP_54	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3840	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_73	HAP_57	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3852	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_75	HAP_59	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG3858	-	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT	HAP_63	HAP_50	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4004	-	Fazenda Experimental da Embrapa - AP	HAP_77	HAP_60	S

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4046	-	Fazenda Experimental da Embrapa - AP	HAP_61	HAP_48	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4049	-	Fazenda Experimental da Embrapa - AP	HAP_69	HAP_34	N
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4058	-	Fazenda Experimental da Embrapa - AP	HAP_81	HAP_63	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4062	-	Fazenda Experimental da Embrapa - AP	HAP_78	HAP_61	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4155	-	Fazenda Experimental da Embrapa - AP	HAP_77	HAP_60	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4198	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_79	HAP_62	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4200	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_82	HAP_64	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4204	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_83	HAP_65	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4206	-	Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA	HAP_84	HAP_66	S
<i>Elaenia flavogaster</i>	UFG4232	-	Salvaterra PA 154 Km 5, Ilha do Marajó - PA	HAP_38	HAP_28	N
<i>Elaenia frantzii</i>	-	EU311049	Panamá	HAP_97	HAP_78	N
<i>Elaenia frantzii</i>	-	EU311059	El Salvador	HAP_96	HAP_78	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia gigas</i>	-	EU311092	Peru	HAP_117	HAP_96	N
<i>Elaenia gigas</i>	-	EU311100	Bolívia: La Paz, Prov. B. Saavedra, 68 km by road E Charazani, Quita Calzon	HAP_116	HAP_95	N
<i>Elaenia martinica</i>	-	EU311061	Puerto Rico: Cabo Rojo, Llanos Costa, 0.5 km NNW mouth Arroyo Cazul	HAP_110	HAP_89	N
<i>Elaenia martinica</i>	-	EU311079	Cayman isl.: Grand Cayman, Queens Highway	HAP_109	HAP_88	N
<i>Elaenia martinica</i>	-	EU311088	St. Vincent	HAP_108	HAP_87	N
<i>Elaenia mesoleuca</i>	-	EU310944	-	HAP_113	HAP_92	N
<i>Elaenia mesoleuca</i>	-	EU310945	-	HAP_114	HAP_93	N
<i>Elaenia obscura obscura</i>	-	EU311077	Peru: Pasco, Playa Pampa, 8 km NW Cushi on trail to Chaglla	HAP_106	HAP_86	N
<i>Elaenia obscura obscura</i>	-	EU311083	Peru: Pasco, Playa Pampa, 8 km NW Cushi on trail to Chaglla	HAP_107	HAP_85	N
<i>Elaenia obscura obscura</i>	-	EU311087	Bolívia: Sta Cruz, La Pajcha ca 28 km S Samaipata	HAP_105	HAP_85	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia olivina</i>	-	EU311096	Venezuela: Bolivar, Cerro Guanay, Camp III	HAP_132	HAP_108	N
<i>Elaenia olivina</i>	-	EU311178	Venezuela: Amazonas, Tamacuari	HAP_130	HAP_106	N
<i>Elaenia olivina</i>	-	EU311184	Venezuela: Bolivar, Auyan Tepui, Camp I, 1700 m	HAP_131	HAP_107	N
<i>Elaenia olivina</i>	-	EU311186	Venezuela: Amazonas, Cerro Yavi, 2100 m	HAP_133	HAP_106	N
<i>Elaenia pallatangae</i>	-	EU311048	Peru: Pasco, Playa Pampa, 8 km NW Cushi on trail to Chaglla	HAP_138	HAP_113	N
<i>Elaenia pallatangae</i>	-	EU311101	Peru: Cajamarca, Quebrada Lanchal, 8 km ESE Sallique	HAP_137	HAP_112	N
<i>Elaenia pallatangae intensa</i>	-	EU311169	Peru: Cusco	HAP_135	HAP_110	N
<i>Elaenia pallatangae intensa</i>	-	EU311183	Peru: Cajamarca, Quebrada Lanchal, 8 km ESE Sallique	HAP_134	HAP_109	N
<i>Elaenia pallatangae intensa</i>	-	EU311192	Peru: Piura, Cruz Blanca, 33 km by road SW Huancabamba	HAP_136	HAP_111	N
<i>Elaenia pallatangae pallatangae</i>	-	EU311189	Equador: Carchi, below Laurel	HAP_139	HAP_110	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia parvirostris</i>	-	EU311075	Bolívia: Santa Cruz, Comunidad Karapari, Estancia San Julian, 1000 m W of Rio Parapeti	HAP_99	HAP_80	N
<i>Elaenia parvirostris</i>	-	EU311076	Peru: Loreto, Amazonas Isla Pasto, 80 km NE Iquitos, 80 m	HAP_102	HAP_82	N
<i>Elaenia parvirostris</i>	-	EU311081	Bolívia: El Beni	HAP_98	HAP_79	N
<i>Elaenia parvirostris</i>	-	EU311102	Bolívia: Chuquisaca, Sopachuy	HAP_100	HAP_81	N
<i>Elaenia parvirostris</i>	-	KJ810369	Uruguai, Artigas (Estado)	HAP_101	HAP_79	N
<i>Elaenia pelzelni</i>	-	EU311080	Peru: Loreto, Amazonas Isla Pasto, 80 km NE Iquitos, 80 m	HAP_103	HAP_83	N
<i>Elaenia pelzelni</i>	-	EU311086	Peru: Loreto, Amazonas Isla Pasto, 80 km NE Iquitos, 80 m	HAP_104	HAP_84	N
<i>Elaenia ruficeps</i>	-	EF501917	--	HAP_95	HAP_77	N
<i>Elaenia ruficeps</i>	-	EU311069	Venezuela: Amazonas, Unturan	HAP_94	HAP_76	N
<i>Elaenia sordida</i>	-	EU311105	Brasil: Andaraí, Fazenda Mocambo	HAP_129	HAP_105	N

Espécie	Voucher	Nº de acesso Genbank	Local de coleta/ origem	Haplótipo MATRIZ1025	Haplótipo MATRIZ546	Análise morfometria
<i>Elaenia spectabilis</i>	-	EU311051	Brasil: Alagoas	HAP_120	HAP_99	N
<i>Elaenia spectabilis</i>	-	EU311065	Brasil: Piauí, P. N. Serra das Confusões	HAP_121	HAP_98	N
<i>Elaenia spectabilis</i>	-	EU311066	Brasil: Piauí, P.N. Serra das Confusões	HAP_119	HAP_98	N
<i>Elaenia spectabilis</i>	-	EU311107	Peru: Loreto, 7 km SW Jeberos	HAP_118	HAP_97	N
<i>Elaenia spectabilis</i>	-	EU311108	Bolívia: Pando, Nicolas Suarez, 12 km by road S of Cobja, 8 km W on road to Mucden	HAP_122	HAP_97	N
<i>Elaenia strepera</i>	-	EU311097	Bolívia: Chuquisaca, Sopachuy	HAP_125	HAP_102	N
<i>Elaenia strepera</i>	-	EU311098	Bolívia: Palmarcito	HAP_126	HAP_103	N
<i>Elaenia strepera</i>	-	EU311099	Bolívia: Chuquisaca, Sopachuy	HAP_127	HAP_104	N
<i>Elaenia strepera</i>	-	EU311104	Bolívia: Chuquisaca, Sopachuy	HAP_124	HAP_101	N
<i>Elaenia strepera</i>	-	EU311106	Bolívia: Chuquisaca, Sopachuy	HAP_128	HAP_101	N
<i>Elaenia strepera</i>	-	EU311109	Bolívia: Palmarcito	HAP_123	HAP_100	N

Anexo 2. Tabela com os números de tombo/voucher por espécie de cada indivíduo utilizado nas análises morfométricas coletados na coleção ornitológica do Museu de Zoologia da USP – MZUSP.

Espécie	Número de tombo/ voucher da coleção ornitológica do museu de zoologia da USP - MZUSP
<i>Elaenia cristata</i>	80419, 85043, 94206, 82956, 83355, 83356, 83357, 83358, 38096, 52990, 52991, 52992, 52993, 52994, 65272, 89007, 38187, 63349, 69347, 69348, 74493, 81607, 89001, 89002, 89003, 89004, 89005, 89006, 93108, 98545, 98547, 98548, 98549, 98550, 98608, 98609, 98610, 98611, 98612, 98626, 3374, 15868, 15869, 19832, 19833, 38395, 38396, 38397, 38558, 42461, 42462, 42463, 42843, 42866, 42932, 75870, 85044, 90120, 40175, 40176, 40177, 34276, 75341, 75342, 75344, 75345, 75346, 75347, 75348, 75349, 75350, 75351, 75352, 75353, 75354, 75355, 75356, 56131, 56132, 56133, 56134, 56135, 56136, 2603, 8092, 75953, 79683, 79684, 79685, 79686, 79687, 79688, 79689, 79690, 79691, 79692, 79694, 7971, 15871, 75343
<i>Elaenia chiriquensis</i>	39158, 16810, 16842, 16910, 16916, 16917, 17942, 20221, 59617, 27701, 27702, 27703, 27705, 34070, 52986, 65270, 65271, 68465, 68467, 68468, 68469, 68470, 68472, 68473, 68474, 68475, 68476, 68478, 68479, 70730, 70731, 70732, 70733, 70734, 70735, 74065, 74066, 75180, 91856, 73799, 73800, 23890, 30214, 30215, 32542, 32543, 32544, 32545, 69350, 69351, 69352, 69353, 74575, 79387, 79388, 88408, 88409, 3373, 32726, 32727, 35964, 35965, 42456, 42457, 42458, 42459, 47089, 47090, 47091, 47092, 47093, 47094, 47095, 58996, 58997, 58998, 58999, 59000, 63090, 63091, 84131, 90117, 90119, 37016, 56137, 73387, 5938, 7969, 8094, 8429, 8993, 9814, 28643, 53685, 53686, 53688, 53689, 53690, 53692, 53693, 53694, 53695, 53696, 53697, 53698, 53699, 53700, 53701, 53705, 97992, 79695, 79696, 79697, 79698, 79699, 79700, 79701, 79702, 80875, 80876, 80877, 116614, 116619
<i>Elaenia flavogaster</i>	37546, 37547, 37548, 7530, 82446, 82447, 82448, 82449, 82450, 10265, 10266, 14213, 14217, 33648, 33646, 33647, 51946, 51947, 51948, 51949, 52976, 52977, 52978, 15478, 51950, 51951, 51952, 51953, 52978, 52980, 52981, 52982, 52983, 52984, 52985, 68463, 70741, 70742, 70743, 70744, 70745, 70746, 70747, 70748, 70749, 70750, 70752, 70753, 70754, 70755, 70757, 74787, 75174, 75175, 75176, 75177, 75178, 75179, 94698, 16034, 16035, 25490, 25491, 25492, 25493, 25494, 25495, 25496, 25497, 25498, 25499, 25500, 25501, 25502, 25503, 25504, 25505, 25506, 25507, 25509, 25510, 25511, 34695, 34696, 75959, 78941, 88711, 97996, 73571, 73572, 13274, 17152, 17153, 18417, 18418, 23878, 23879, 23880, 23881, 30216, 30217, 30218, 35235, 64182, 69345, 98522, 98523, 98607, 98619, 12758, 37807, 37808,

45602, 47084, 58995, 59604, 59605, 59606, 59607, 59608, 59610, 59611, 59612, 59613, 59614, 59615, 59616, 62043, 62044, 85969, 88191, 90116, 90118, 95484, 95698, 95699, 95700, 95701, 75338, 75339, 75340, 77787, 77788, 56128, 56129, 56130, 73388, 94207, 94208, 1051, 4273, 4399, 4705, 4706, 7970, 8095, 12103, 13927, 24248, 26442, 26443, 26445, 28832, 29113, 31741, 48495, 48545, 48546, 50373, 50374, 50375, 50377, 50378, 50379, 50380, 51520, 51522, 51524, 51525, 53315, 53669, 53670, 53671, 53672, 53673, 53674, 53675, 53676, 53677, 53678, 53679, 53680, 53681, 53683, 53684, 55254, 61268, 64424, 64425, 66288, 67857, 71072, 73888, 75957, 75958, 79703, 79704, 40169



COMPRIMENTO DA ASA



COMPRIMENTO DA CAUDA



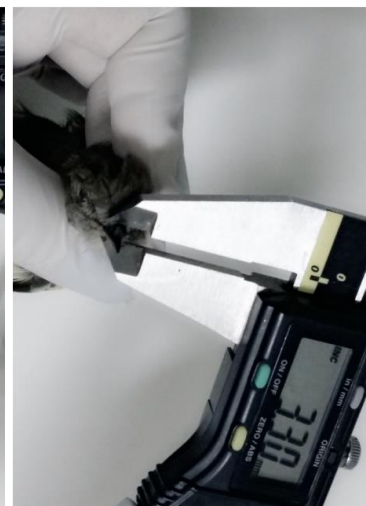
COMPRIMENTO DO TARSO



COMPRIMENTO DO BICO



LARGURA DO BICO



ALTURADO BICO

Anexo 3. Modo de coleta das medidas morfométricas para as espécies *E. cristata*, *E. chiriquensis* e *E. flavogaster* utilizadas neste estudo.

Anexo 4. Relação de iniciadores (*primers*) utilizados nesse estudo para amplificação do gene mitocondrial ND2 e para a sexagem molecular, a sequência do *primer* e a referência.

Gene	Primer	Sequência 5'-3'	Referência
ND2	LMET	GGCCCATACCCCGAAAATGA	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
ND2	H6313	CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
ND2	L5758	GGNGGNTGAATRGGNYTNAAYCARAC	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
ND2	H5766	RGAKGAGAARGCYAGGATYTTKCG	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
CHD	2550F	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	Fridolfsson; Ellegren, 1999
CHD	2718R	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	Fridolfsson; Ellegren, 1999

Anexo 5. Estatística descritiva da morfometria das espécies de *Elaenia* alvos deste estudo. Todas as medidas estão em milímetros.

Medida	Espécie	N	Média	Desvio Padrão
Comprimento da asa	<i>Elaenia cristata</i>	179	65,07	5,07
	<i>Elaenia chiriquensis</i>	211	67,99	5,20
	<i>Elaenia flavogaster</i>	245	70,30	3,66
Comprimento da cauda	<i>Elaenia cristata</i>	178	66,97	5,28
	<i>Elaenia chiriquensis</i>	210	67,28	3,80
	<i>Elaenia flavogaster</i>	243	73,19	4,23
Comprimento do tarso	<i>Elaenia cristata</i>	179	18,52	1,08
	<i>Elaenia chiriquensis</i>	211	16,90	1,03
	<i>Elaenia flavogaster</i>	243	19,15	1,17
Comprimento do bico	<i>Elaenia cristata</i>	178	8,29	1,02
	<i>Elaenia chiriquensis</i>	211	7,31	0,53
	<i>Elaenia flavogaster</i>	244	7,36	0,55
Largura do bico	<i>Elaenia cristata</i>	175	8,71	0,85
	<i>Elaenia chiriquensis</i>	212	7,69	0,65
	<i>Elaenia flavogaster</i>	245	8,55	0,71
Altura do bico	<i>Elaenia cristata</i>	175	4,40	0,53
	<i>Elaenia chiriquensis</i>	210	3,97	0,46
	<i>Elaenia flavogaster</i>	243	4,27	0,46

N = número de indivíduos utilizados na análise, média e desvio padrão para cada espécie e cada medida.

Anexo 6. Análise de variância – ANOVA para as espécies *Elaenia cristata*, *Elaenia chiriquensis* e *Elaenia flavogaster* geradas com o pacote MASS no programa R.

	Gl	SumSq	Média	F valor	P (>F)
Espécie	2	457449	228724	147	<2e-16 ***
Resíduos	614	955231	1556		

Códigos de significância: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Valores de grau de liberdade (Gl), soma dos quadrados (SumSq), média, valor do teste estatístico e valor de significância.

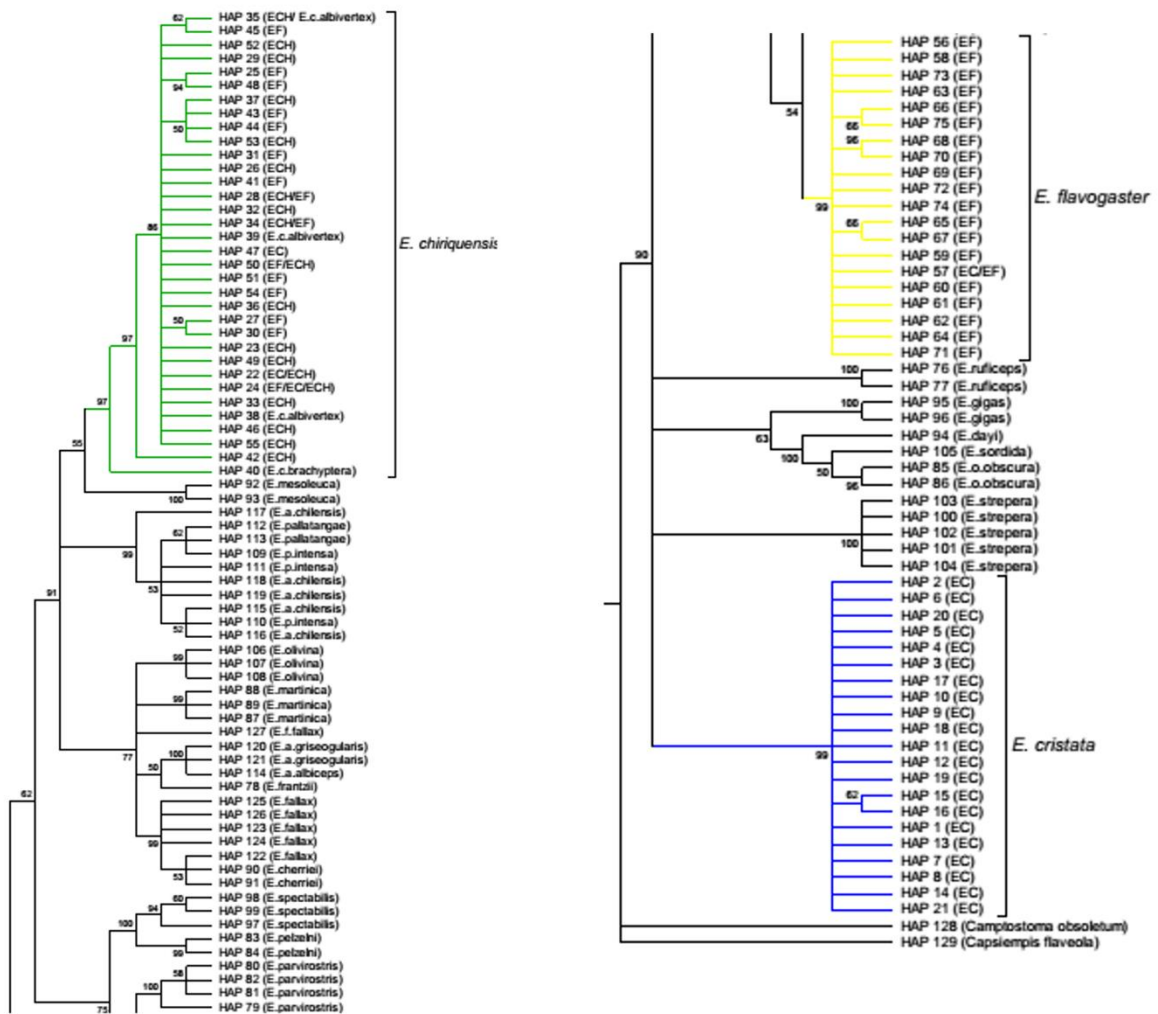
Anexo 7. Teste de *Tukey* da diferença honestamente significativa (HSD) gerado com o pacote MASS no program R para verificar a diferença estatística entre as espécies com base nas medidas.

Relação entre espécies	Diferença	lwr	upr	p ajust.
<i>E. cristata-E. chiriquensis</i>	62,541836	52,9855	72,09817	0,00000
<i>E. flavogaster-E. chiriquensis</i>	53,310881	44,49232	62,12944	0,00000
<i>E. flavogaster-E. cristata</i>	-9,230955	-18,4894	0,027482	0,05088

Os valores significativos estão em negrito.



Anexo 8. Árvore obtida pelo método de Verossimilhança para a MATRIZ1025, com 160 haplótipos do gênero *Elaenia* e grupos externos, usando os parâmetros de: 1000 réplicas de *bootstrap*; modelo de Tamura-Nei; uso de distribuição *gamma* e sítios invariáveis; deleção parcial; uso das três bases; Valores de *bootstrap* do nó para *E. chiriquensis* = 99; *E. flavogaster* = 99; *E. cristata* = 100.



Anexo 9. Árvore obtida pelo método de Verossimilhança para a MATRIZ546, com 129 haplótipos do gênero *Elaenia* e grupos externos, usando os parâmetros de: 1000 réplicas de bootstrap; modelo de Tamura-Nei; uso de distribuição *gamma* e sítios invariáveis; deleção parcial; uso das três bases; Valores de bootstrap do nó para *E. chiriquensis* = 97; *E. flavogaster* = 99; *E. cristata* = 99.