



FACULTÉ
DES SCIENCES

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

Proboscis monkey, *Nasalis larvatus*: feeding ecology and seed dispersal in a fragmented forest landscape

Thesis submitted by Valentine THIRY

In fulfilment of the requirements of the PhD Degree in Sciences (“Docteur en Sciences”)

Academic year : 2019-2020

Supervisor : Martine VERCAUTEREN

Anthropology and Human Genetics

Co-supervisors: Roseline C. BEUDELS-JAMAR

Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Conservation Biology Unit

& Benoît GOOSSENS

Cardiff University, Cardiff School of Biosciences



Copyright

© Thiry Valentine, Janvier 2020

A mes parents Didier Thiry et Marie-Claire Defays
La vie est un long fleuve tranquille

Résumé

La biodiversité mondiale est fortement menacée, essentiellement dans les zones tropicales et, en particulier, en Asie du sud-est. Les pressions qui pèsent sur les écosystèmes sont toutes d'origine anthropique, les principales étant la perte, la fragmentation et la dégradation des habitats naturels. De fait, depuis les années 70, l'île de Bornéo fait face à des diminutions considérables de son couvert forestier, engendrées par des déboisements sélectifs à grande échelle des forêts de basse altitude, riveraines et côtières, par les feux intentionnels et par les conversions des forêts en terres agro-industrielles, essentiellement les plantations de palmiers à huile. Ces dernières constituent actuellement de véritables barrières aux déplacements de nombreuses espèces animales, notamment les primates.

Endémique de l'île de Bornéo, le nasique, *Nasalis larvatus*, est aujourd'hui une espèce en danger d'extinction. Dans la région Kinabatangan (notre site d'étude, État de Sabah), les plantations de palmiers à huile représentent la principale menace pour ses populations. Pour assurer la conservation de cette espèce dans ce paysage très fragmenté, de nouvelles zones doivent être identifiées, protégées et réhabilitées. C'est dans ce contexte que s'intègre notre projet de recherche dont les principaux objectifs sont de déterminer les espèces végétales-clés dans l'alimentation de *N. larvatus*, ainsi que d'évaluer le rôle que joue le nasique dans la dispersion des graines.

Notre étude fournit les premières données alimentaires pour plusieurs groupes de *N. larvatus*, le long du fleuve Kinabatangan [Lots 5, 6 et 7 du Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary (LKWS)], illustrant un régime alimentaire diversifié (89 taxons végétaux), davantage frugivore lors de la saison des pluies (Chap. 3). L'analyse des particules fécales de *N. larvatus* indique une variation saisonnière de l'efficacité de mastication, indiquant un changement alimentaire entre la saison sèche et la saison des pluies (Chap. 4). De plus, notre étude montre que la composition nutritionnelle et minérale des végétaux consommés par les nasiques varie selon l'espèce consommée, le type d'aliment (jeune feuille ou fruit immature) ingéré et la distance aux cours d'eau (Chap. 5). Nous observons également que les graines de huit espèces de plantes sont déféquées intactes par ces primates et que, parmi elles, les graines de *Nauclea* spp. germent davantage que celles issues des fruits de *Nauclea orientalis* (Chap. 6). Finalement, nous mettons en évidence que 45 espèces de mammifères et d'oiseaux dépendent de l'espèce d'arbre *N. orientalis* pour se reposer et se nourrir, le long des rives du fleuve Kinabatangan (Chap. 7).

Par le biais de méthodes variées (ex : observations directes, camera traps, DNA metabarcoding, analyses fécales et nutritionnelles, et tests de germination), notre projet de recherche a contribué à améliorer les connaissances sur l'écologie alimentaire du nasique et a mis en évidence le rôle insoupçonné que joue cette espèce de colobiné dans la dispersion des graines. De plus, elle a souligné l'importance de préserver les zones riveraines, tant pour *N. larvatus* que pour les autres espèces animales. Ces données écologiques sont utiles tant pour les projets de restauration des habitats dégradés que pour les programmes d'éducation et de sensibilisation à la conservation de la nature à Sabah. Notre étude souligne l'urgence de mieux protéger, de réhabiliter et d'assurer la connectivité des forêts riveraines du fleuve Kinabatangan, afin d'assurer la conservation à long terme de *N. larvatus* et des autres espèces animales de la région. Nous recommandons la plantation de certaines espèces végétales-clés, telles que *Ficus racemosa*, *Nauclea orientalis* et *Octomeles sumatrana* lors des programmes de restauration des habitats dégradés et d'établissement de corridors forestiers.

Abstract

Biodiversity, or life on Earth, is now threatened everywhere. It is particularly clear in the tropics, including in South-East Asia. Ecosystems are burdened with increasing anthropogenic pressures. The combined effects of loss, fragmentation and degradation of natural habitats are the most burning threats. Since the 70s, the forest cover of the island of Borneo has been declining at a very fast rate, mostly due to large-scale selective logging of high-value low-altitude, riverine and coastal forests, to the huge and long lasting forest fires, as well as to land-use changes, in particular the conversion of natural forests into agro-industrial lands, mostly oil palm plantations. These large-scale plantations currently constitute actual barriers to the movements of many animal species, including primates.

Endemic to Borneo, the proboscis monkey, *Nasalis larvatus*, is endangered. In the Kinabatangan region (our study site, in Sabah), oil palm plantations constitute the main threat for this primate population. In Sabah, like its remaining range, if the objective is to ensure the conservation of *N. larvatus* in this increasingly fragmented forest landscape, new areas need to be identified, protected and rehabilitated. In this context, our research project aimed at determining key-food plant species for proboscis monkey as well as assessing the role this colobine plays in seed dispersal.

Our study provides the first dietary data for several groups of proboscis monkeys along the Kinabatangan River [Lots 5, 6 and 7 in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary (LKWS)], showing a diversified diet (89 plant taxa), more frugivorous during the wet season (Chap. 3). The faecal particle size analysis reveals a seasonal variation in chewing efficiency, indicating a dietary change between the dry and the wet seasons (Chap. 4). Our study also shows that the nutritional and mineral composition of the plants consumed by proboscis monkeys varies according to plant species, plant item (young leaves or immature fruits), as well as to the distance to water bodies (Chap. 5). Our study also unveils that seeds of eight plant species are found intact in proboscis monkey faeces, and that ingested *Nauclea* spp. seeds showed a higher germination success than control seeds from *Nauclea orientalis* fruits (Chap. 6). Finally, we showed that 45 mammalian and bird species also rely on *N. orientalis* trees for food and/or shelter, along the Kinabatangan riverbanks (Chap. 7).

Using various methods (ex: direct observations, camera traps, DNA metabarcoding, faecal and nutritional analyses, and germination tests), our research project is a contribution to the knowledge of proboscis monkey feeding ecology. It highlighted the unexpected role that these colobines play in seed dispersal. The study also underlined the importance of well-preserved riparian forests, for *N. larvatus* and for many other species. The ecological data gathered during this project will fit into the planning of restoration programs of degraded habitats. Such data will also be useful to education and awareness programs on nature conservation in Sabah. Our data underlines the urgency to better protect, rehabilitate and ensure the connectivity of forested habitats along the Kinabatangan River, in order to ensure the long-term conservation of *N. larvatus* and other species in the region. We recommend that several key-plant species, such as *Ficus racemosa*, *Nauclea orientalis* and *Octomeles sumatrana*, should be considered in habitat rehabilitation plans and corridor establishment.

Remerciements

Cette thèse de doctorat était une belle aventure : des défis à relever, des voyages enrichissants et des moments inoubliables. Entre les longues heures passées sur le bateau à observer les nasiques, les levers et couchers de soleil quotidiens sur le fleuve Kinabatangan, les chants des gibbons et des calaos, les longues marches en forêt ou encore cet enthousiasme à chaque petite découverte, je ne saurais dire ce qui définit le mieux cette expérience unique. Tout le monde le sait, un doctorat n'est pas rose tous les jours ; c'étaient aussi des heures de galère en laboratoire, des doutes, du stress, de la fatigue (se lever à 4h30 c'est trop tôt), des pluies torrentielles et beaucoup (trop) de moustiques. Mais finalement, cette thèse de doctorat c'était, avant toute chose, une expérience pleine de rencontres et d'amitiés. Pendant ces cinq années, j'ai eu l'occasion de travailler, de collaborer, d'échanger et de discuter avec des personnes plus incroyables les unes que les autres, tant ici que là-bas. Je ne vous remercierai sûrement jamais assez.

Tout d'abord, je voudrais remercier mes promoteurs et co-promoteurs Martine Vercauteren, Roseline C. Beudels-Jamar et Benoît Goossens. Martine, je me souviens encore de la première fois où je suis venue vous voir pour discuter de mon envie d'étudier les singes. Merci de m'avoir accueillie à bras ouverts et de m'avoir chouchoutée et écoutée pendant toutes ces années. Je vous remercie aussi pour vos nombreuses relectures et vos conseils avisés en statistiques, en enseignement ou encore en ponctuation ; le tout accompagné d'un café et d'un petit bout de chocolat. Roseline, merci de m'avoir ouvert les yeux sur la biologie de la conservation, cette discipline qui t'est si chère ! Tu m'as encouragée et poussée à toujours aller plus loin ! Ton enthousiasme et ta volonté sans faille m'ont beaucoup inspirée ! Merci pour tout ! Benoît, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir accueillie dans ton centre de recherche et d'avoir fait de mon rêve une réalité. Ta passion pour Sabah et ta détermination pour la conservation de la nature sont une vraie source d'inspiration. Merci de m'avoir suivie, malgré les kilomètres. Je vous remercie tous les trois de m'avoir supervisée tout au long de cette aventure et de m'avoir soutenue dans les moments plus difficiles.

Je souhaiterais aussi remercier tous les membres de mon comité d'accompagnement, Claire Detrain, Olivier Hardy, Marie-Claude Huynen, ainsi que Régine Vercauteren Drubbel. Merci pour votre présence et vos conseils judicieux. Claire, merci de m'avoir motivée et poussée à rendre ma thèse cette année, un petit « coup de fouet » venu à point. Olivier, c'était un réel plaisir de réaliser la partie *DNA metabarcoding* de mon projet avec toi et dans ton labo. Je te remercie pour tes conseils, tes relectures et pour les discussions intéressantes qu'on a eues. Marie-Claude, je te remercie pour tes précieux conseils en primatologie et pour ta présence. Régine, peu importe l'heure de la journée (ou de la nuit), l'endroit

(Bruxelles, Rome, Strasbourg, Chicago, Sabah) et les circonstances, tu es toujours là et c'est très réconfortant! Tu m'a appris énormément, que ce soit dans le domaine de la primatologie ou de la confiance en soi. Je te promets d'essayer de ne plus me tirer « trop » de balles dans le pied.

I also would like to thank all my collaborators and all the people I had the opportunity to work with during my research. Thank you Marcus Clauss (University of Zurich) for your warm welcome in your lab, and for your undeniable help in the writing up of findings. Charles Vairappan (University Malaysia Sabah), thank you for having me two month in your lab, for introducing me to your students and for helping me to work in the nutritional field. Without botanical experts, this PhD project would not have existed. Therefore, I would like to thank Dr. Joan Pereira and her team (Forest Research Centre, Sandakan) for their availability and expertise. And finally, I would like to kindly thank you Ikki Matsuda (Chubu University) for your interest in my research project, and for sharing with me your knowledge about proboscis monkeys, as well as your experiences, thoughts, and methods during all these years.

I also would like to thank the members of my Jury who agreed to review my PhD thesis: Marie-Claude Huynen (Université de Liège), Nikki Tagg (CRC, Antwerpen; Born Free Foundation, UK), Vincent Nijman (Oxford Brookes University), Patrick Mardulyn (Université libre de Bruxelles) and Claire Detrain (Université libre de Bruxelles).

Sans financement, la recherche et la biologie de la conservation seraient impossibles. Dès lors, je voudrais remercier tous les organismes de financement qui ont soutenu mon projet de recherche. Je remercie le Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture – Fonds National pour la Recherche Scientifique (FRIA-FNRS) de m'avoir octroyé une bourse de recherche pendant quatre ans. Je souhaite aussi remercier le Fonds Léopold III pour la conservation et l'exploration de la nature, le fonds Gustave Boël-Sofina et le FNRS d'avoir participé au financement de mes missions de terrain et de mes participations aux conférences à l'étranger. I also would like to thank the Sabah Biodiversity Centre and the Sabah Wildlife Department for supporting my project and allowing me to conduct my research in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary. A huge thank to Audrey Adella Umbol, for helping me with the visa procedures, permits, and for handling wonderfully all this administrative work.

My experience in Sabah was incredible. I loved being in the field, but not only for the sunrises and sunsets, monkeys, and nature. In fact, all this would not have had the same taste without Mohd Shah Fitri Bin Rosli (Koko), Nazrul Bin Moh Natsyir (Alut), Samsir Bin Laimun, Daniel Bin Robot, Jesrine Bin Binsu, Roslee Bin Rahman (Lee), Petriedi B. Ambo Tola (Doyo) and Amaziasizamoria Jumail (Maz). You always made fun of my poor orientation skills and desperately tried to teach me how to use

my parang! Always joking, you were an unbelievable support and help in the forest and on the boat; thank you for having me in your DG family. Terima Kasih! Thank you also to Peter Bin Asun, for supervising the organization, as well as supplying and helping me with materials/constructions. I also would like to thank Nursyakila Binti S Rofian (Kila), Ryeca Kardu, Hasna Binti Salin and the entire team for their daily smiles, jokes, kind attentions and lovely – healthy – meals; it helped me to keep smile after long hours in the forest. I also thank Li Yuen and Vivian Sien for their incredible support in the ITBC lab. Finally, I would like to thank all volunteers and students who lived with me in DG and/or helped me with data collection, especially Danica Stark, Meaghan Evans, Luke Evans, Sergio Guerrero Sanchez, Leona Wai and Dean. Special thanks to Danica for introducing me to the proboscis monkeys in 2011. It was a pleasure to share jungle moments with you, as well as yoga, sushi and beers in KK. Thank you so much for all your advices, supports and comments during my PhD.

Je voudrais remercier Oriana Bhasin. Merci pour ta présence et ton soutien inébranlable sur le terrain. Merci aussi pour les petites tasses de thé réconfortantes, les séances de yoga « borring », et les observations des nasiques sous la pluie (toujours avec un style imbattable).

Les aventures, ce n'était pas qu'à Bornéo. A Bruxelles j'ai aussi eu mon compte de petites péripéties et pour cela j'ai notamment pu compter sur Arthur Boom, Esra Kaymak et Chedly Kastally. Arthur, je te remercie d'avoir été à mes côtés sur le projet *DNA metabarcoding*. Tu m'as beaucoup aidée, motivée, mais par-dessus tout, tu m'as tellement fait rire ; c'était super de faire équipe à deux ! Esra, je voudrais aussi te remercier d'avoir travaillé sur les paillasse avec moi, délicatement, toujours de façon si pédagogue et avec le sourire. Chedly, merci pour ta patience et ton aide inconditionnelle quand je pataugeais dans mes statistiques. Ton humilité, ton rire unique et tes expressions « has been » ont égayé les heures passées sur ces scripts R.

Je voudrais aussi remercier tous mes collègues souriants de l'Unité de Biologie de la Conservation et à l'IRSNB, du service d'Anthropologie et Génétique Humaine et du service d'Évolution Biologique et Écologie à l'ULB : René-Marie Lafontaine, Henry Robert, Yves Laurent, Isabelle Bachy, Justine Jacquemin, Leslie Wilmet, Vinciane Fack, Stéphane Cherrier, Laurence Vigin et Elise Toussaint. René, merci d'avoir égayé mes moments d'écriture en te « baladant » dans les bureaux et de m'avoir encouragée chaque jour. Leslie, je te remercie d'avoir été une partenaire de bureau incroyable. Merci pour l'initiation à l'eau chaude, les (très) longues heures de papotes et tes partages d'expériences et de voyages. Vinciane, merci pour les moments partagés ensemble, autour d'un café, à parler de nos singes et d'évasion. Merci de m'avoir motivée sur cette dernière ligne droite ! Laurence et Elise, merci pour vos petites attentions, que ce soient du gingembre confit ou un câlin plein d'étoiles. Yves, merci mille fois pour les morceaux de chocolat noir quotidiens. Je voudrais aussi remercier Geoffrey Fadeur, de l'herbarium de l'ULB, pour son aide et ses conseils avisés. Et, je remercie de façon plus générale toutes

les personnes de l'EBE. Vous m'avez toujours accueillie comme l'une des vôtres, dans un labo de feu, avec une équipe soudée et dynamique. Merci pour tout !

Je remercie Monsieur Yves Scailteur (Lycée Émile Jacqmain) de m'avoir donné le goût de la biologie, avec ses nombreuses anecdotes sur des espèces des quatre coins du monde. Je voudrais aussi remercier mes amies et amis qui me soutiennent depuis toujours. François, merci pour ton coaching incroyable. Emily merci d'être là, même depuis le Sud. On repart quand manger des chocos sur un bateau ensemble ? !

Spéciales dédicaces à mes Babies, mes Copines et mes Grogros d'amour ! Les copines, entre les escapades à Grenade, les maisons hantées de Vyle-et-Tharoul, Jean-Jacques et les cuillères en bois, merci de m'avoir motivée et toujours poussée à avancer. Mes grogros, merci pour les balades à cheval, les carrousels et les « il avait les mots » qui m'ont boostée ces dernières années. Merci pour votre présence inconditionnelle (en deux mots...), et votre petit côté fleur bleue aussi ! Merci aussi à Aventurlotte et Gaventure pour leur visite à DG, leur bizutage en forêt et nos longues parties de rikikis. Je remercie aussi les coureurs du CEPAL pour leur attention sans faille et mes Pouliches de compét qui m'ont appris à ne « jamais abandonner » !

Un énorme merci aussi à Benjamin ! Merci d'avoir été à mes côtés pendant cette aventure et de m'avoir toujours encouragée. Merci aussi pour tous tes petits plats réconfortants et nos longues balades et escapades au grand air ; c'était la clé pour que je garde le cap, le sourire et un cerveau 'fonctionnel' sur la fin. Ta présence, cette dernière année, a été indispensable à mon équilibre et j'attends avec impatience l'occasion de te présenter les nasiques.

Finalement, je voudrais remercier ma famille chérie. Sophie, merci pour ta *forza* depuis l'Ombrie. Merci pour la semaine passée chez toi, entre rédaction, spritz et escapade sur le lac Trasimène ; une carotte venue à point !

Finalement, un énorme merci mes Groseilles d'amour. Ma sœur, je te remercie pour ton écoute (même dans la lune) et ta folie. Maman, c'est sûrement suite à tes choix douteux de lecture (« La petite taupe qui voulait savoir qui lui avait fait sur la tête ») que je me suis retrouvée à analyser des cacas de nasiques pendant toutes ces années ; et je ne te remercierai jamais assez. Au moindre flanchement, tu es là ! Merci de m'avoir toujours encouragée et d'avoir fait de moi la femme que je suis ! Papa, je sais qu'on ne dit pas merci à son père, mais tu comprendras qu'aujourd'hui c'est difficile de me retenir... Je te remercie d'avoir toujours soutenu mes rêves d'enfant et de m'avoir donné le goût des balades en forêts. J'essaie de toujours me dépasser dans les projets que j'entreprends, en pensant, naïvement, à la fierté que tu pourrais ressentir. Je suis sûre que tu trouveras un certain parallèle entre ton Ardèche adorée et mon fleuve Kinabatangan (mais je ne m'y baignerai pas).

Table des matières

Résumé	vii
Abstract	ix
Remerciements	xi
Table des matières	xv
Liste des figures	xvii
Liste des tableaux	xxi
Liste des abréviations	xxiii
1 Introduction générale	1
1.1 Crise mondiale de la biodiversité	3
1.2 L'île de Bornéo : Biodiversité menacée	14
1.3 Objectifs et structure de la thèse	21
2 Sujet, site d'étude et méthodologies générales	25
2.1 Sujet d'étude : <i>Nasalis larvatus</i> (Wurmb, 1787)	27
2.2 Site d'étude : Les plaines inondables du fleuve Kinabatangan	36
2.3 Méthodologies générales	40
3 Régime alimentaire de <i>Nasalis larvatus</i> au sein de la plaine Kinabatangan	55
3.1 Abstract	60
3.2 Introduction	61
3.3 Methods	64
3.4 Results	70
3.5 Discussion	77
4 Variations saisonnières de la taille des particules fécales chez <i>Nasalis larvatus</i>	95
4.1 Abstract	100
4.2 Introduction	101
4.3 Material and Methods	102
4.4 Results	103
4.5 Discussion	106
5 Aspects nutritionnels des aliments consommés par <i>Nasalis larvatus</i>	111
5.1 Abstract	116
5.2 Introduction	117
5.3 Methods	118
5.4 Results	120
5.5 Discussion	126

5.6	Conclusions -----	128
6	Dispersion des graines par <i>Nasalis larvatus</i> -----	133
6.1	Abstract -----	138
6.2	Introduction -----	139
6.3	Methods -----	140
6.4	Results -----	144
6.5	Discussion -----	146
7	Interactions entre la communauté animale et <i>Nauclea orientalis</i> -----	153
7.1	Abstract -----	158
7.2	Introduction -----	159
7.3	Materials and methods -----	160
7.4	Results -----	163
7.5	Discussion -----	167
8	Discussion générale et conclusion -----	173
8.1	Principales découvertes -----	175
8.2	Limites de l'étude et perspectives -----	180
8.3	État de la conservation du nasique -----	184
8.4	Implications pour la conservation du nasique à Sabah -----	186
8.5	Conclusion -----	192
9	Références bibliographiques -----	193
10	Annexes -----	209
10.1	Figures et tableaux -----	211
10.2	Utilisation et sélection des sites dorts par les nasiques le long du fleuve Kinabatangan -----	217
10.3	Livret de terrain « <i>Tree and vine species at Danau Girang Field Centre</i> » -----	234

Liste des figures

- Figure 1.** Courbes cumulées du nombre d’extinctions d’espèces de vertébrés depuis 1500 avec une courbe “background” des taux naturels d’extinction estimée à 2 E/SMY (Ceballos *et al.*, 2015) ----- 3
- Figure 2.** Courbes représentant la croissance de la population mondiale et l’augmentation des extinctions d’espèces sur Terre [adaptée de Scott, 2008]----- 4
- Figure 3.** Schématisation de trois facteurs influençant la modification des habitats. Où la couleur noire représente un habitat non-perturbé ; la couleur grise un habitat perturbé (Irwin, 2016) ----- 5
- Figure 4.** Distribution géographique des différentes Zones Écologiques Globales (GEZ) (©FAO, 2010) ; les forêts tropicales sont représentées en rouge, rose et mauve. ----- 6
- Figure 5.** Distribution mondiale des plantations de palmiers à huile et des conflits potentiels pour la biodiversité a) zones d’importance prioritaire pour la biodiversité terrestre ; b) distribution mondiale des plantations de palmiers à huile ; c) zones potentiellement convertibles en cultures de palmiers à huile ; d) zoom sur les surfaces allouées à la culture de palmiers à huile en Asie du sud-est (Fitzherbert *et al.*, 2008). ----- 7
- Figure 6.** Illustration d’un modèle représentant les trois composantes de la dispersion de graines par les primates et différentes variables impliquées dans ce modèle (adaptée de Garber, and Lambert, [1998] et Razafindratsima *et al.*, [2018]) ----- 10
- Figure 7.** Distribution mondiale de la richesse spécifique en primates et proportions des espèces menacées et des populations en déclin selon les régions (Estrada *et al.*, 2017)----- 11
- Figure 8.** a) Localisation de l’île de Bornéo (encerclée en rouge) en Asie du sud-est (© Map Republic) ; b) Carte administrative de l’île de Bornéo (© wikimedia commons)----- 14
- Figure 9.** Localisation du Sundaland sur le plateau continental de Sunda (en orange) (Darman, 2014) ----- 15
- Figure 10.** Distribution des 25 hotspots de biodiversité sur Terre (Myers *et al.*, 2000) ----- 15
- Figure 11.** Illustration des 13 espèces de primates rencontrées sur l’île de Bornéo: a) *Pongo pygmaeus*, b) *Nasalis larvatus* ; c) *Hylobates muelleri*, d) *Hylobates agilis*, e) *Presbytis chrysomelas*, f) *P. hosei*, g) *P. frontata*, h) *P. rubicunda*, i) *Trachypithecus cristatus*, j) *Macaca nemestrina*, k) *M. fascicularis*, l) *Nycticebus menagensis*, m) *Tarsius bancanus* ----- 16
- Figure 12.** Cartes illustrant a) le couvert forestier sur l’île de Bornéo en 1973 (en vert), et b) les prédictions du couvert forestier en 2020 (vert clair), 2050 (vert), et 2080 (vert foncé) (Wich *et al.*, 2015)----- 18
- Figure 13.** Distribution des aires protégées (vert foncé) et des autres types d’allocations des terres sur l’île de Bornéo (Wich *et al.*, 2015) ----- 20

Figure 14. Cadre conceptuel de la thèse-----	23
Figure 15. Illustration présentant <i>Nasalis larvatus</i> spp. <i>larvatus</i> et <i>N. l. spp. orientalis</i> (© Stephen Nash, Mittermeier & Rylands 2013)-----	27
Figure 16. Illustration d'un nasique dans la bande dessinée "Les aventures de Tintin. Vol 714 pour Sydney" (© Hergé, 1968).-----	28
Figure 17. Photographies a) d'une femelle nasique adulte avec un jeune, et b) d'un mâle adulte (© Rudi Delvaux) -----	29
Figure 18. a) Répartition géographique théorique de <i>Nasalis larvatus</i> (IUCN, 2019) ; b) Distribution des populations (n=15) de <i>Nasalis larvatus</i> sur l'île de Bornéo (Phillipps & Phillipps, 2016). -----	30
Figure 19. Cartes de Bornéo représentant a) la topographie de l'île (© wikipédia), b) les zones déboisées depuis 1973 et les zones encore boisées en 2015 (Gaveau <i>et al.</i> , 2016) -----	31
Figure 20. Illustration d'un estomac de colobiné. Où « Tubiform st. » correspond à estomac tubiforme, et « Gl. st. » à estomac glandulaire (Matsuda <i>et al.</i> , 2019a) -----	34
Figure 21. Diversité de la faune de la région Kinabatangan a) une panthère nébuleuse ; b) un éléphant de Bornéo ; c) un calao largup (<i>Anorrhinus galeritus</i>); d) des loutres (<i>Lutogale perspicillata</i>); e) un ours malais ; f) des cochons barbus (photos prises par des <i>camera traps</i> ©DGFC)-	37
Figure 22. Carte illustrant les forêts protégées et non-protégées au sein de la plaine inondable du fleuve Kinabatangan, et la localisation du centre de recherche <i>Danau Girang Field Centre</i> (Stark, 2018) -----	38
Figure 23. Photo aérienne du fleuve Kinabatangan bordé de plantations de palmiers à huile (© Hutan) -----	39
Figure 24. Illustration du déboisement de 2015 le long du fleuve Kinabatangan et des points GPS correspondants à un groupe de nasiques dans cette zone (Stark <i>et al.</i> , 2017a)-----	39
Figure 25. Environnement du centre de recherche <i>Danau Girang Field Centre</i> ; a) et f) Fleuve Kinabatangan ; b) Logements ; c) et e) Embarcadère et bateaux à moteurs utilisés pour aller sur le terrain ; et d) Centre de recherche-----	40
Figure 26. Planning des missions de terrain dans le <i>LKWS</i> -----	41
Figure 27. Carte du site d'étude représentant les 245 localisations d'échantillonnage de fèces de nasiques -----	43
Figure 28. Machine à tamis animée utilisée pour étudier la taille des particules fécales de nasiques	45
Figure 29. Illustration schématisant la méthode de <i>DNA metabarcoding</i> utilisée pour étudier le régime alimentaire du nasique -----	47
Figure 30. Carte du site d'étude présentant la localisation des 25 plots botaniques -----	49
Figure 31. Illustration d'un plot de 50 m sur 50 m et des différents axes tracés au fur et à mesure---	50
Figure 32. Carte du site d'étude indiquant la position des 25 plots de phénologie au sein des Lots 5,6 et 7 -----	51

- Figure 33.** Map of the study area: **a** The island of Borneo with the location of the Kinabatangan Floodplain in the State of Sabah; **b** The Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary with its 10 protected lots (dark grey) and the Forest Reserve (light grey); **c** Zoom on the study site with the Lots 5, 6 and 7 and the location of the 25 vegetation plots inside Lot 6. ----- 65
- Figure 34.** Distribution of the 276 MOTUs according to their occurrence in faeces and their mean proportion of faecal read coverage in samples where they were detected ----- 69
- Figure 35.** Accumulation curve of plant DNA sequences (MOTUs) found in proboscis monkey faecal samples (n=155) collected in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary between May 2015 and March 2017. ----- 72
- Figure 36.** Seasonal variation in the frequencies of occurrences of seven MOTUs detected in proboscis monkey faeces----- 73
- Figure 37.** Taxonomic resolution of the diet of proboscis monkeys using two methods (direct behavioural observations and DNA metabarcoding) ----- 74
- Figure 38.** Venn diagrams of plant families, genera and species detected by DNA metabarcoding and direct behavioural observation methods ----- 76
- Figure 39.** Percentage of faecal samples of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) collected during different months that contain intact seeds ----- 104
- Figure 40.** Distribution of proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) faecal particles after wet sieving analysis. Each petri dish represents one of the 10 cascade sieves, ordered from 8 mm until 0.025 mm mesh size. The sample PMF217-1 collected on the 28th of January 2017 was used for this example. ----- 104
- Figure 41.** Variation in proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) MPS over the course of the observation period (November-July) ----- 105
- Figure 42.** MPS variation of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) across seasons----- 105
- Figure 43.** Nutritional, crude ash and tannin content (%) of the young leaves from 10 of the plant species consumed by proboscis monkeys. ----- 122
- Figure 44.** Mineral content (%) of the young leaves from 10 of the plant species consumed by proboscis monkeys. ----- 123
- Figure 45.** Graphic representation of the Principal Component Analysis performed using the CP, ADF, CP/ADF, CLipid, Ash and Tannin variables. ----- 124
- Figure 46.** Maps of the study area: a the State of Sabah in Malaysian Borneo with the location of the Kinabatangan River; b the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary, with its 10 protected forest lots (dark grey) and the Forest Reserve (light grey); c zoom on the study site in lots 5, 6 and 7, with faecal sampling locations----- 141
- Figure 47.** Germination curves of seeds growing under shade conditions (60 d) followed by sun exposure (20 d) for three treatments; F = *Nauclea* spp. seeds ingested by proboscis monkeys (n = 201), RF = seeds from ripe *N. orientalis* fruits (n = 153), and UF = seeds from unripe *N.*

orientalis fruits (n = 104); Each dip in the survival curve represents a germination event.

----- 146

Figure 48. Position of the canopy and the ground-level camera traps (green circles) along the eight-km river transect surveyed to identify interactions between *N. orientalis* and the animal community. ----- 162

Figure 49. Probability of encountering different animal species in *N. orientalis*, given their position in trees and detection time. Sleeping animals were not included. ----- 166

Liste des tableaux

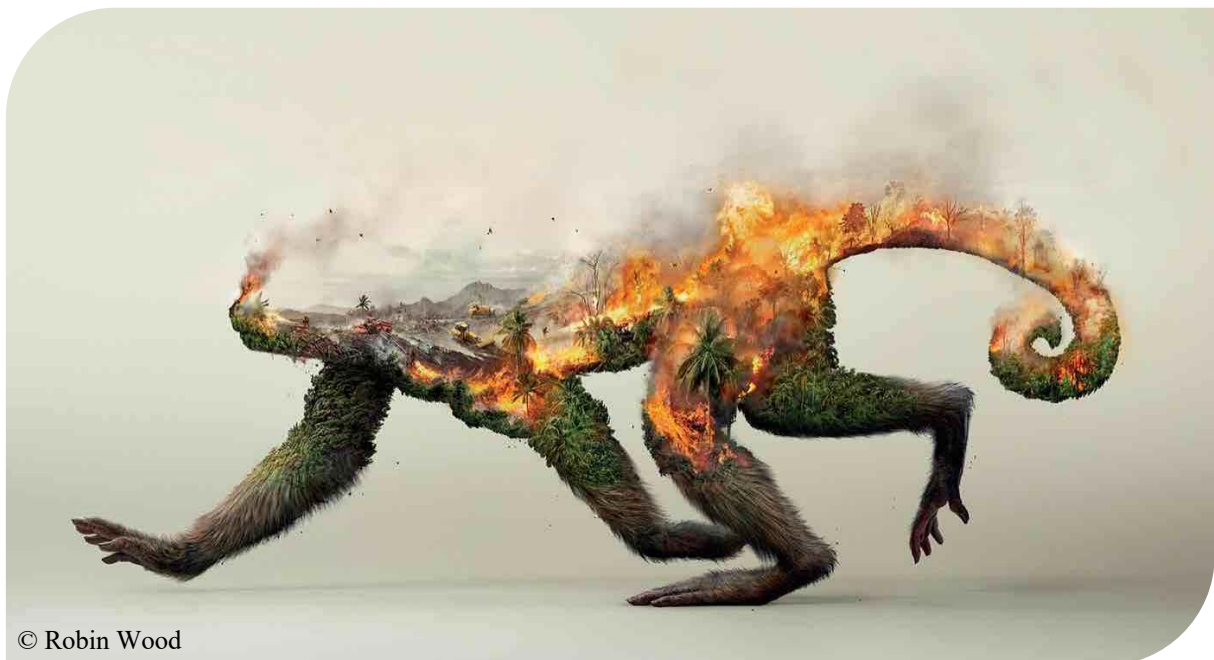
Tableau 1. Statuts des surfaces de l'île de Bornéo entre 1973 et 2080 -----	17
Tableau 2. Descriptions des cinq traitements utilisés dans les tests de germination de graines avancés -----	44
Tableau 3. Liste des 10 espèces de plantes consommées par les nasiques dans le site d'étude et nombre d'arbres ou lianes échantillonnés pour les analyses nutritionnelles et minérales -----	52
Table 4. List of the 20 top-key plants recorded by behavioural direct observations and DNA metabarcoding methods-----	75
Table 5. List of the 18 plant species only recorded by DNA metabarcoding method-----	77
Table 6. Mean particle size $\pm$ SD of 28 faecal samples of proboscis monkeys (<i>Nasalis larvatus</i>) measured using two series of sieves (indicated by the sieve size of the smallest and largest sieves) and with or without taking the maximum particle length (MPL, when particles were retained on the largest sieve) into account in the MPS calculation -----	106
Table 7. Ten plant species consumed by proboscis monkeys along the Kinabatangan River during the study and sampled for nutritional analyses (with N = number of sampled individuals). -	119
Table 8. Nutrient, tannin and mineral content (Mean $\pm$ SD) of young leaves (N=74, 10 species) consumed by proboscis monkeys sampled along the Kinabatangan riverside.-----	121
Table 9. Values of the variables (ADF, CP, CP/ADF, CLipid, Ash and Tannin) used in the Principal Component Analysis -----	124
Table 10. Comparison of nutritional, tannin and crude ash composition (mean ($\pm$ SD), in % dry matter) of young leaves and unripe fruits (<i>Nauclea orientalis</i> and <i>Ficus racemosa</i>) consumed by proboscis monkeys at the riverside. -----	125
Table 11. Comparison of mineral content (mean ($\pm$ SD), in mg/kg dry matter) of young leaves and unripe fruits (<i>Nauclea orientalis</i> and <i>Ficus racemosa</i>) consumed by proboscis monkeys at the riverside. -----	125
Table 12. Comparison of nutritional, tannin and crude ash composition (mean ($\pm$ SD), in % dry matter) of young leaves of five consumed species between riverside and inside the forest (> 250 m). -----	125
Table 13. Comparison of mineral content (mean ($\pm$ SD), in mg/kg dry matter) of young leaves of five consumed species between riverside and inside the forest (> 250 m). -----	126
Table 14. Categories (gut passed and control) and treatments (F1, F2, FR1, FR2 and FR3) of <i>Nauclea</i> spp. and <i>N. orientalis</i> seeds used during germination trials, set up in Petri dishes filled with forest soil.-----	143

Table 15. List of intact seeds recorded in proboscis monkey faeces (n = 155) collected between 2015 and 2017 -----	144
Table 16. Germination fate of intact seeds after ingestion by proboscis monkeys. -----	145
Table 17. Information recorded during direct observation sessions along river transect when animals interacted with <i>N. orientalis</i> tree. -----	161
Table 18. Ground level and canopy camera trap survey details and active camera trap-days (CT-Days). -----	162
Table 19. Bird species (Class Aves) interacting with <i>N. orientalis</i> , with the number of times they were observed by both detection techniques (CT = camera traps, DO = direct observations). -	164
Table 20. Mammal species interacting with <i>N. orientalis</i> , with the number of times they were observed by both detection techniques (CT = camera traps, DO = direct observations). -----	165
Tableau 21. Localisations, superficies et catégories UICN des 16 aires protégées abritant <i>N. larvatus</i> -----	186
Tableau 22. Objectifs pour la conservation de <i>N. larvatus</i> à Sabah (2019-2028) -----	187

Liste des abréviations

ADF	Acide Detergent Fibre
ANOVA	Analysis of Variance
BRLU	Herbarium de l'Université libre de Bruxelles
CBH	Circumference at Breast Height
CLipid	Crude lipid
CP	Crude Protein
CR	Critically Endangered
CT	Camera Traps
DGFC	Danau Girang Field Centre
DNA	Desoxyribonucleic acid
DO	Direct observations
E/SMY	Extinction per Million Species per Year
EN	Endangered
ENSO	El-Niño Southern Oscillation
F	Gut-passed seeds, from proboscis monkey faeces (F1 & F2)
FAO	Food and Agriculture Organisation
FRC	Forest Research Centre
F1	Gut-passed seeds without faecal material
F2	Gut-passed seeds with faecal material
FR1	Control seeds from unripe fruits
FR2	Control seeds from ripe fruits, without pulp
FR3	Control seeds from ripe fruits, with pulp
ITBC	Institute for Tropical Biology Conservation
GENP	Genting Plantations Berhad
KK	Kota Kinabalu
KOPEL	Koperasi Pelancongan (ONG d'écotourisme coopératif)
LC	Least Concern
LKF	Lower Kinabatangan Floodplain
LKWS	Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary
MOTU	Molecular Operational Taxonomic Unit
MPS	Mean Particle Size
MRT	Mean Retention Time
NT	Near Threatened
ONG	Organisation Non Gouvernementale
PA	Presence / Absence
PCA	Principal Component Analysis
PHVA	Population and Habitat Viability Analysis
RF	Control seeds from ripe fruits (FR2 & FR3)
SFD	Sabah Forestry Department
SWD	Sabah Wildlife Department
UF	Control seeds from unripe fruits (FR1)
UICN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature
VU	Vulnérable
WWF	World Wide Fund for Nature

1 Introduction générale



© Robin Wood

1.1 Crise mondiale de la biodiversité

1.1.1 Extinction massive des espèces

La Terre abrite une diversité biologique unique (Allaby & Garrat, 2006; Mora *et al.*, 2011) : 1,9 million d'espèces sont décrites, mais une large majorité ne l'est pas (Chapman, 2009), puisqu'on estime que 5 à 11 millions d'espèces peuplent notre planète (Chapman, 2009; Mora *et al.*, 2011; Costello *et al.*, 2013). Or, les taux actuels d'extinction des espèces sont alarmants [100 à 1000 fois plus élevés que les taux naturels d'extinction¹ (Pimm *et al.*, 1995)], particulièrement depuis 1900 (et l'industrialisation). Et ces taux continuent de croître (Figure 1) (Pimm *et al.*, 2014; Ceballos *et al.*, 2015), suggérant que de nombreuses espèces pourraient disparaître avant même d'être découvertes (Mora *et al.*, 2011).

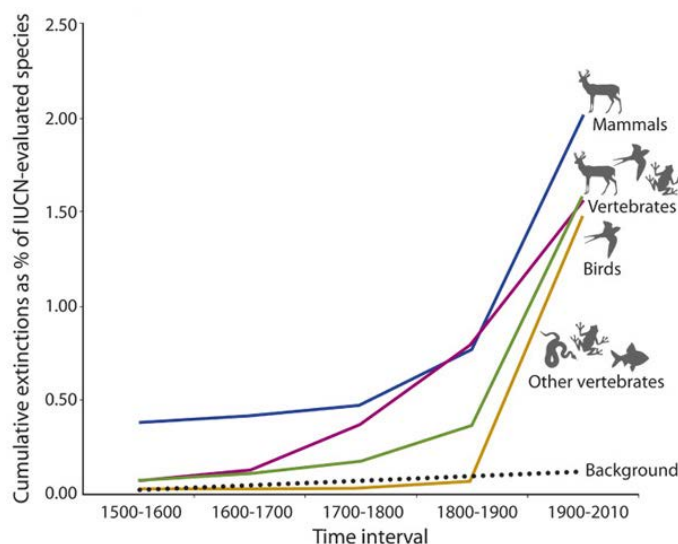


Figure 1. Courbes cumulées du nombre d'extinctions d'espèces de vertébrés depuis 1500 avec une courbe "background" des taux naturels d'extinction estimée à 2 E/SMY (Ceballos *et al.*, 2015)

Beaucoup de scientifiques considèrent que la 6^{ième} extinction de masse de la planète a commencé (Barnosky *et al.*, 2011; Dirzo *et al.*, 2014; Kolbert, 2014; Ceballos *et al.*, 2015; Régnier *et al.*, 2015). Les rapports de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN), qui a pour mission notamment d'évaluer et de suivre les statuts de conservation de nombreuses espèces, montrent clairement la dégradation de la situation (Vié *et al.*, 2009). Le bilan est sévère puisqu'on estime actuellement à 28 000 le nombre d'espèces menacées d'extinction (statuts VU, EN et CR²), soit plus

¹ Les taux naturels d'extinction des espèces sont estimés à 0,1-1 E/MSY (=Extinction per Million Species per Year)

² Statuts de conservation de l'UICN : « VU » = Vulnerable (Vulnérable), « EN » = Endangered (En danger), « CR » = Critically endangered (En danger critique).

d'un quart des espèces évaluées par l'UICN (2019). Dans son dernier rapport sur l'état de la planète (2018), le WWF estime qu'en moyenne les populations de vertébrés ont diminué de 60% entre 1970 et 2014. En ce qui concerne les mammifères, la moitié des populations décline dans la nature et 25% des espèces sont menacées d'extinction (Schipper *et al.*, 2008).

Les scientifiques s'accordent pour dire que l'homme est le principal, l'unique responsable de la perte actuelle de biodiversité (Vitousek *et al.*, 1997; Ehrlich & Pringle, 2008; Dirzo *et al.*, 2014; Kolbert, 2014; Ceballos *et al.*, 2015). Les menaces anthropiques qui affectent les espèces sont des activités non-durables (agriculture intensive, surpêche, exploitation minière, déforestation, etc.) qui surexploitent les ressources disponibles, détruisent et dégradent les habitats, polluent l'environnement et induisent le réchauffement climatique ; l'introduction d'espèces invasives est également néfaste (Ehrlich & Pringle, 2008; May, 2010; WWF, 2016). Toutes ces menaces pour la biodiversité sont fortement liées à la croissance de la population humaine mondiale et à l'augmentation de la consommation *per capita* (Figure 2) (May, 2010; Pimm *et al.*, 2014).

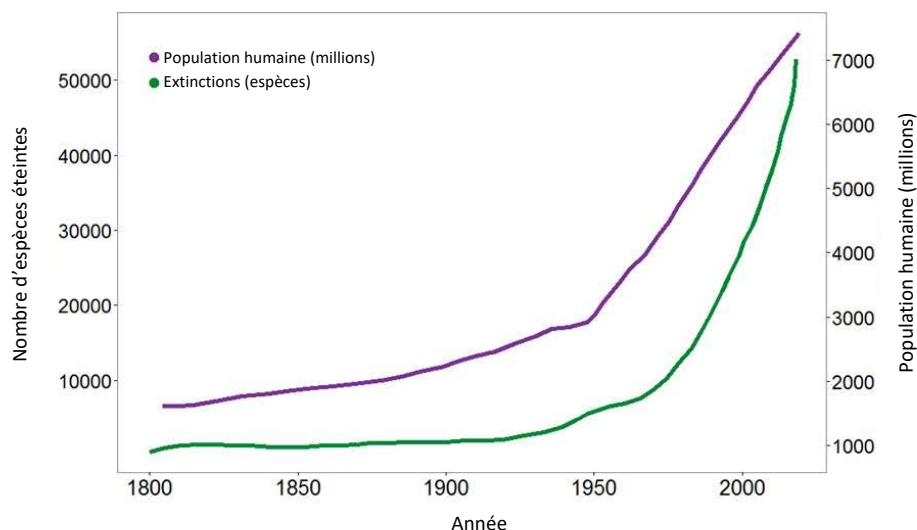


Figure 2. Courbes représentant la croissance de la population mondiale et l'augmentation des extinctions d'espèces sur Terre [adaptée de Scott, 2008]

La perte de biodiversité est aujourd'hui une problématique mondiale extrêmement préoccupante. Toutes les zones géographiques sont concernées, avec toutefois des degrés différents. Ainsi, les zones tropicales sont particulièrement touchées (Dirzo *et al.*, 2014).

1.1.2 La perte, la fragmentation et la dégradation des habitats

La perte, la fragmentation et la dégradation des habitats sont parmi les principales causes du déclin de la biodiversité (Fischer & Lindenmayer, 2007; Newbold *et al.*, 2015). Ces modifications, de plus en plus marquées, affectent la disponibilité, la composition et la diversité des ressources alimentaires des espèces, mais aussi les densités des populations et leur liberté de mouvement (Schwitzer

et al., 2011). La perte d'habitat est définie comme la conversion d'une zone de type « habitat » en zone « non-habitat » (ex : la déforestation) ; la fragmentation se réfère à la subdivision d'un habitat et à l'augmentation de l'isolation des fragments qui en résultent ; la dégradation implique un changement des caractéristiques de l'habitat (ex : effets de lisière en bordures de forêt, perturbations humaines au sein d'un habitat, pollutions, etc.) (Figure 3) (Irwin, 2016). Ci-dessous, nous nous intéresserons davantage à l'un de ces trois facteurs : la perte d'habitat par déforestation, et plus précisément la conversion des forêts tropicales en zones agricoles.

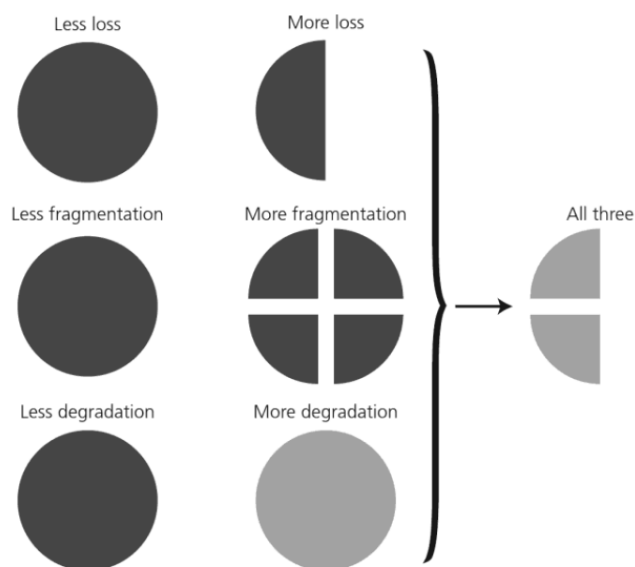


Figure 3. Schématisation de trois facteurs influençant la modification des habitats. Où la couleur noire représente un habitat non-perturbé ; la couleur grise un habitat perturbé (Irwin, 2016)

1.1.3 Déforestation mondiale et statut de conservation des forêts tropicales

1.1.3.1 Introduction

A l'échelle mondiale, 129 millions d'hectares (Mha) de couverture forestière ont été détruits entre 1990 et 2015 (FAO, 2015), soit une perte équivalente à 40 fois la superficie de la Belgique, en 25 ans. Le principal facteur de déforestation est l'expansion des zones agricoles, essentiellement des zones d'agriculture industrielle à grande échelle, mais aussi des zones d'agriculture de subsistance à l'échelle locale. D'autres moteurs de déforestation sont l'expansion des zones urbaines, les infrastructures et activités extractives, telles que les mines (FAO, 2016).

Toutefois, cette diminution des superficies forestières n'est pas répartie de façon homogène à la surface du globe, puisque la majeure partie des zones déboisées se situe dans les régions tropicales (FAO, 2015), extrêmement menacées par l'expansion des terres agricoles (cultures et pâtures) (Geist & Lambin, 2001; Gibbs *et al.*, 2010; Laurance *et al.*, 2014). En effet, entre 1980 et 2000, on estime que plus de 80% de l'expansion des terres agricoles sous les tropiques a nécessité le déboisement et la conversion de forêts intactes (55%) ou perturbées (28%) (Gibbs *et al.*, 2010). Entre 2000 et 2010, on a

recensé, dans les régions tropicales, une perte annuelle nette de surfaces forestières de 7 Mha/an et une augmentation annuelle nette des zones agricoles de 6 Mha/an (FAO, 2016). La situation de ces régions est plus qu'alarmante, puisqu'on estime que la demande mondiale en produits agricoles va augmenter de 50% en 2050, et que ce sont les pays tropicaux qui devront davantage répondre à cette demande (Gibbs *et al.*, 2010).

Ce qui est dramatique, c'est quand on pense à l'incroyable biodiversité qu'abritent les forêts tropicales (Laurance, 2007). En effet, bien qu'elles ne constituent que 7% de la surface terrestre (Allaby & Garrat, 2006) (Figure 4), elles contiennent à elles seules plus de la moitié des espèces animales et végétales terrestres (Shvidenko *et al.*, 2005). Et ce n'est pas tout ; les forêts tropicales fournissent également des services écosystémiques primordiaux, tels que le stockage de carbone, la stabilisation des cours d'eau et des sols, diminuant ainsi les risques d'inondation et d'érosion. De plus, elles abritent de nombreuses populations indigènes, et constituent la pharmacopée d'une grande variété de produits naturels (Laurance, 1999).

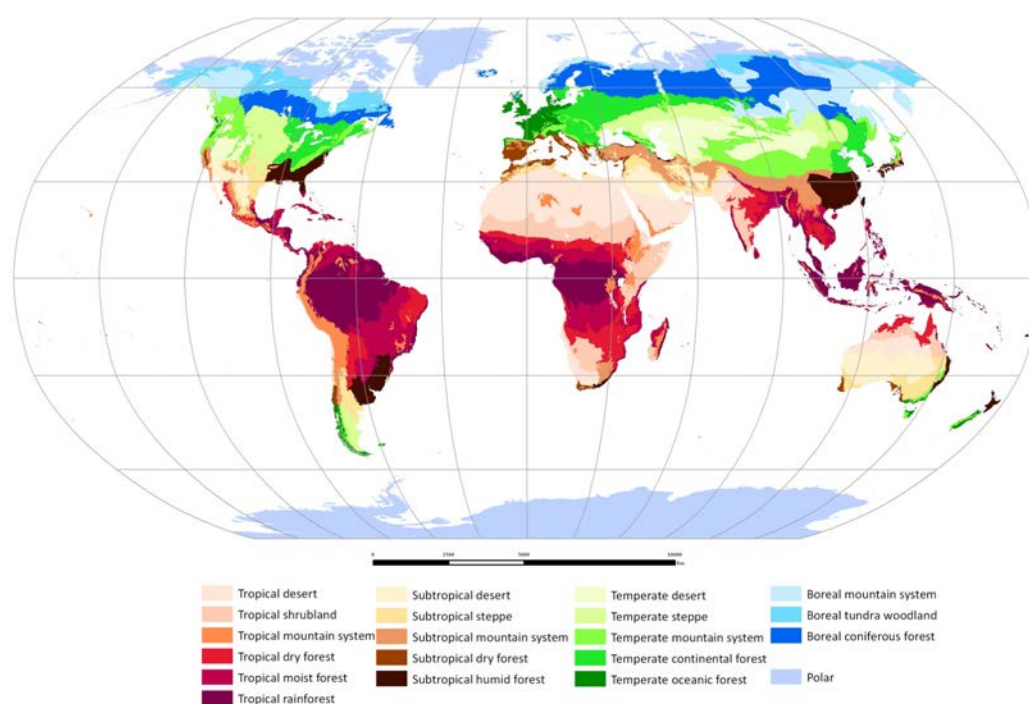


Figure 4. Distribution géographique des différentes Zones Écologiques Globales (GEZ) (©FAO, 2010) ; les forêts tropicales sont représentées en rouge, rose et mauve.

1.1.3.2 L'Asie du sud-est et l'expansion des plantations de palmiers à huile

En comparaison aux autres régions tropicales, l'Asie du sud-est présente les taux relatifs de déforestation les plus élevés. En effet, on estime qu'en 2100, 75% de ses forêts pourraient avoir disparu, ainsi que 42% de sa biodiversité (Sodhi *et al.*, 2004). L'un des principaux moteurs de cette déforestation massive est la conversion des forêts en plantations de palmiers à huile (Turner & Foster, 2009).

Originaire du golfe de Guinée, en Afrique de l'ouest (Michiels, 2011), le palmier à huile, *Elaeis guineensis*, est utilisé par les communautés locales depuis des siècles : les troncs servent à construire des habitations, les feuilles sont utilisées pour fabriquer des toits et les cendres peuvent servir de fertilisant (Greenpeace, 2012). De plus, diverses parties de *E. guineensis* sont traditionnellement utilisées en médecine, notamment en raison de leurs propriétés anti-oxydantes (Owoyele & Owolabi, 2014). Toutefois, les palmiers d'*E. guineensis* sont principalement connus pour leur huile, très prisée dans de nombreux secteurs, tels que l'alimentation, l'oléochimie (ex : cosmétiques) et les biocarburants. Pourquoi cette huile plutôt qu'une autre ? Tout simplement, parce que le rendement des cultures de palmiers à huile (en tonne d'huile par hectare) est imbattable, que l'huile de palme est la moins chère du marché (Michiels, 2011; Greenpeace, 2012; Vijay *et al.*, 2016), et qu'elle peut être utilisée dans de multiples préparations (ex : margarine, huile de friture) (Schmidt & Weidema, 2008).

Près de 15 Mha sont alloués aux plantations d'huile de palme sous les tropiques (Michiels, 2011), au sein de 43 pays (Vijay *et al.*, 2016) (Figure 5b). Les deux principaux pays producteurs d'huile de palme sont l'Indonésie et la Malaisie (Figure 5d), comptabilisant à eux deux 86% de la production mondiale (Rifai *et al.*, 2015). Toutefois, ces deux pays arborent ensemble plus de 80% des surfaces de forêts primaires intactes d'Asie du sud-est (Fitzherbert *et al.*, 2008). Si l'on tient compte de la croissance de la demande mondiale en huiles végétales et biocarburants, et du recouvrement considérable entre les zones d'importance prioritaire en terme de biodiversité terrestre (Figure 5a) et les zones potentiellement convertibles en plantations de palmiers à huile (Figure 5c), il y a lieu de s'inquiéter pour le futur de la biodiversité mondiale (Fitzherbert *et al.*, 2008).

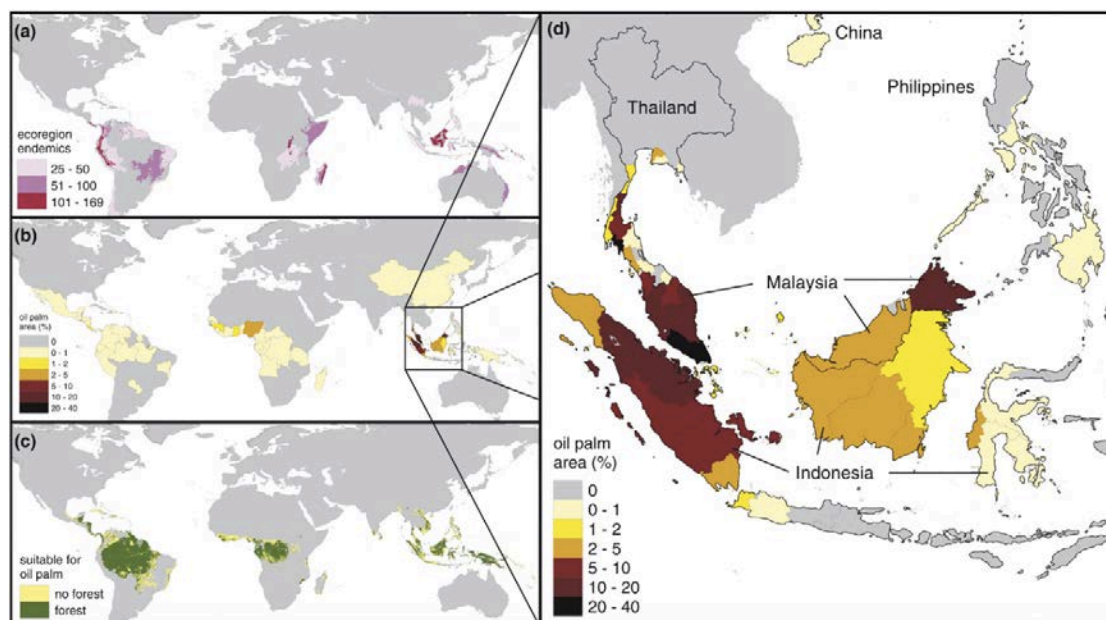


Figure 5. Distribution mondiale des plantations de palmiers à huile et des conflits potentiels pour la biodiversité a) zones d'importance prioritaire pour la biodiversité terrestre ; b) distribution mondiale des plantations de palmiers à huile ; c) zones potentiellement convertibles en cultures de palmiers à huile ;

- d) zoom sur les surfaces allouées à la culture de palmiers à huile en Asie du sud-est (Fitzherbert *et al.*, 2008).

Les monocultures de palmiers à huile sont un désastre écologique. En effet, le drainage des tourbières et les feux de forêts, précédant souvent l'établissement des plantations, sont d'importantes sources d'émission de gaz à effet de serre (Michiels, 2011). Tant en Indonésie qu'en Malaisie, on constate que plus de 55% des plantations de palmiers à huile ont été plantées après élimination totale des forêts (Koh & Wilcove, 2008). De plus, les monocultures requièrent d'énormes quantités d'eau et d'engrais polluants (Michiels, 2011), et sont structurellement beaucoup moins complexes que les forêts (ex : âge uniforme des palmiers, canopée basse, sous-bois clairsemé). Elles abritent également infiniment moins d'espèces animales que les forêts tropicales (Fitzherbert *et al.*, 2008). Pour de nombreux groupes faunistiques, ces plantations sont de véritables déserts écologiques (Peh *et al.*, 2006; Maddox *et al.*, 2007). Finalement, les monocultures de palmiers à huile fragmentent le paysage et constituent des barrières aux déplacements de nombreuses espèces animales, dites « forêt-dépendantes » (Scriven *et al.*, 2017), telles que les primates.

1.1.4 La régénération forestière

1.1.4.1 Introduction

Face aux impacts croissants de la déforestation dans le monde – et plus particulièrement dans les régions tropicales – il est intéressant de comprendre comment les forêts se maintiennent et se régèrent.

A l'échelle du paysage, la régénération naturelle est souvent perçue comme un ensemble de processus à long terme permettant la reconstitution d'une forêt après dégradation. La régénération naturelle se fait à travers plusieurs stades qui se succèdent – soit des stades de succession: les espèces qui poussent lors des premiers stades diffèrent de celles qui croissent lors des stades ultérieurs. La régénération des forêts est influencée par divers facteurs, tels que l'utilisation passée des terres, les premières espèces colonisatrices, le climat, les types de sols et la dispersion des graines depuis les forêts avoisinantes. De plus, les taux et la qualité de régénération dépendent fortement du type de perturbation engendrée. Par exemple, la régénération sera fortement retardée, voir inhibée, sur des terres qui ont longtemps été allouées à de l'agriculture intensive (Chazdon, 2014).

A l'échelle de la plante, la régénération peut être représentée en un cycle de vie dans lequel plusieurs stades se succèdent, passant de la graine, à la plantule et finalement à la plante adulte. Le succès de régénération d'une plante est déterminé par la réalisation de divers processus qui interviennent dans le cycle de la vie de cette plante, tels que la floraison, la pollinisation, la production de graines, la dispersion des graines dans des sites appropriés, la germination de ces graines, l'établissement de plantules et leur croissance en plantes adultes (Bawa *et al.*, 1989; Wang & Smith, 2002). La

pollinisation, la dispersion des graines, et le recrutement des plantules³ sont des processus qui facilitent les transitions entre ces stades de vie, alors que la prédation des graines ou l'herbivorie sont néfastes (Wang & Smith, 2002; Neuschulz *et al.*, 2016). La régénération des plantes est un processus essentiel qui assure le maintien des espèces, des habitats et le fonctionnement des écosystèmes. Les processus écologiques intervenant dans les premières étapes du cycle de régénération de la plante, comme la pollinisation et la dispersion des graines – processus souvent dépendants des interactions entre plantes et animaux – sont les plus affectés par l'homme (Neuschulz *et al.*, 2016).

1.1.4.2 La dispersion des graines

Située à l'interface entre la fin du cycle reproducteur d'une plante adulte et l'établissement de ses futurs descendants (Wang & Smith, 2002), la dispersion des graines est un processus crucial pour la plante et le fonctionnement des écosystèmes (Farwig & Berens, 2012). Elle influence la structure des populations, assure le maintien de la diversité génétique ainsi que la colonisation de nouveaux habitats (Willson & Traveset, 2000), présentant des implications en termes de régénération et conservation des forêts (Wang & Smith, 2002). Dans un paysage fortement fragmenté, il est primordial que la dispersion des graines puisse aussi s'effectuer entre les différents fragments forestiers, pour permettre la régénération des habitats et la survie des espèces animales (Martin, 2008).

Le processus de dispersion de graines est largement documenté dans la littérature (Willson & Traveset, 2000). Il est défini comme le mouvement d'une diaspore, propagule, à partir de la plante mère (Howe & Smallwood, 1982; O'Dowd & Gill, 1986). Plusieurs vecteurs de dispersion sont observés dans la nature ; tous se composent du suffixe « chorie » qui vient du grec « khôrein » signifiant « se mouvoir ». Certains vecteurs sont abiotiques, comme le vent (anémochorie), l'eau (hydrochorie) ou la gravité (barochorie) ; d'autres sont biotiques et impliquent des animaux (zoochorie) (Parolin *et al.*, 2013). Au sein de cette dernière catégorie, on distingue généralement plusieurs variantes, en fonction de la façon dont la graine est traitée/manipulée : stockée par les animaux (ex : rongeurs) (synzoochorie) ; transportée à l'extérieur de l'animal (ex : attachée à ses poils ou plumes) (épizoochorie) ; transportée par les fourmis (myrmécochorie) ; consommée puis déféquée ou régurgitée intacte (endozoochorie) (Hulme, 2002). L'endozoochorie est une interaction mutualiste – tant bénéfique pour la plante que pour l'animal – puisque l'animal se nourrit des fruits produits par la plante et participe ainsi à la dispersion des graines de cette dernière (Herrera, 2002; Anderson, 2012). De nombreuses espèces de plantes dépendent des animaux pour la dispersion de leurs graines, en particulier dans les régions tropicales où la majorité des plantes produisent des fruits qui sont consommés par des vertébrés, tels que des mammifères et des oiseaux (Howe & Smallwood, 1982).

³ Le recrutement des plantules comprends trois mécanismes : la germination de la graine, sa survie en plantule et sa croissance en une plante adulte (Erikson & Ehrlén, 2008)

Comme illustré dans la Figure 6 ci-dessous, la dispersion des graines par les animaux (ex : primates) se compose de trois phases, influencées par divers facteurs. Lors de la phase de pré-dispersion, les animaux sont attirés par les fruits. Ensuite, ils peuvent manipuler les graines de diverses façons et les transporter (dispersion). Finalement, lors de la phase de post-dispersion : les graines viables font face à la prédation par les rongeurs ; sont exposées aux pathogènes ; sont déplacées ou enfouies dans le sol (dispersion secondaire) par les insectes (ex : bousiers) ; sont stockées/cachées par des vertébrés (ex : écureuils) ; germent, s'établissent en plantule et tentent d'atteindre le stade adulte pour se reproduire (Garber & Lambert, 1998).

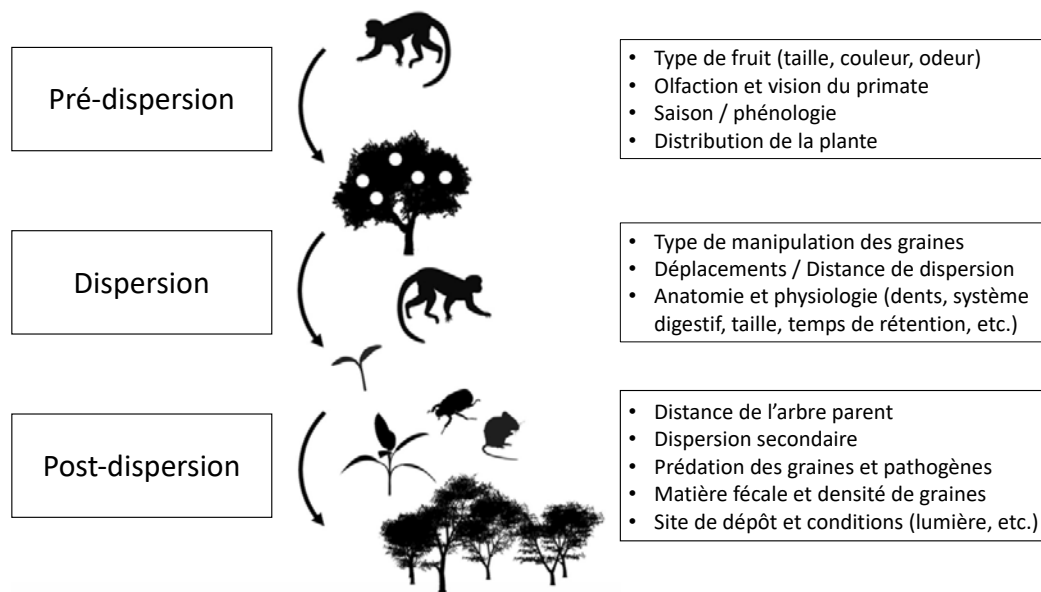


Figure 6. Illustration d'un modèle représentant les trois composantes de la dispersion de graines par les primates et différentes variables impliquées dans ce modèle (adaptée de Garber, and Lambert, [1998] et Razafindratsima et al., [2018])

Pourquoi est-il intéressant pour une graine de s'éloigner de la plante-mère ? Plusieurs ennemis naturels, tels que les prédateurs de graines, les herbivores, pathogènes et parasites, sont généralement actifs à proximité de la plante-mère, où les ressources abondent. Il est dès lors bénéfique pour une graine d'être dispersée à distance de cette dernière, augmentant ainsi ses chances de survie et d'établissement en plantule (Willson & Traveset, 2000). En plus de cet avantage spatial [notamment décrit dans le modèle de Janzen-Connell (Janzen, 1970; Connell *et al.*, 1984)], les frugivores peuvent favoriser la germination des graines par divers mécanismes. Lorsqu'ils se nourrissent des fruits, la pulpe (contenant généralement des inhibiteurs de germination) est digérée, alors que les graines peuvent être rejetées intactes au sol ou passer à travers leur tractus digestif ; elles peuvent donc germer. De plus, l'enveloppe protégeant la graine peut être chimiquement et/ou mécaniquement scarifiée lors du passage dans le système digestif animal, modifiant ainsi la capacité et/ou vitesse de germination des graines. Finalement, la matière fécale dans laquelle gisent les graines peut agir comme fertilisant et augmenter les chances de germination des graines (Traveset & Verdu, 2002). Toutefois, l'efficacité d'un disperseur (dépendant

de la qualité et quantité des graines dispersées) est aussi influencée par le comportement de l'animal (ex : déplacements), sa morphologie et sa physiologie (ex : temps de rétention) (Schupp, 1993).

1.1.5 Les primates : acteurs majeurs de la régénération forestière

L'ordre des primates présente une richesse spécifique remarquable puisqu'il ne comprend pas moins de 504 espèces, réparties au sein de 79 genres et 16 familles (Estrada *et al.*, 2017), illustrant des variations morphologiques remarquables, notamment en terme de masse corporelle : de 30 g chez le microcèbe pygmée (*Microcebus myoxinus*) jusqu'à 200 kg chez le gorille de l'Ouest (*Gorilla gorilla*) (Chapman & Russo, 2010). Les primates sont essentiellement observés en zone tropicale, au sein de quatre grandes régions : les néotropiques, l'Afrique continentale, Madagascar et l'Asie (Figure 7) (Estrada *et al.*, 2017).

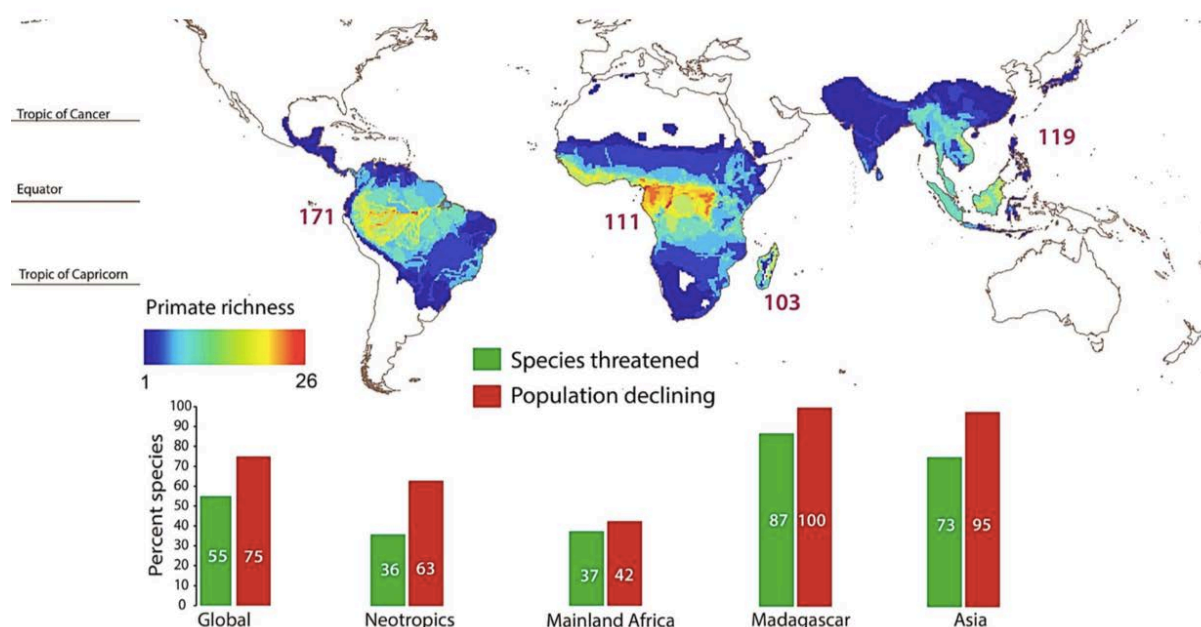


Figure 7. Distribution mondiale de la richesse spécifique en primates et proportions des espèces menacées et des populations en déclin selon les régions (Estrada *et al.*, 2017)

Les primates jouent des rôles écologiques cruciaux au sein des écosystèmes (Chapman *et al.*, 2013; Estrada *et al.*, 2017). Les primates, frugivores et folivores, sont d'ailleurs qualifiés d'ingénieurs des écosystèmes puisqu'ils influencent la structure de leur environnement, en modifiant, maintenant ou créant de nouveaux habitats (Chapman *et al.*, 2013). Les primates jouent un rôle majeur dans la dispersion des graines (Razafindratsima *et al.*, 2018). Si ce processus écologique est souvent le premier à être cité, il est important de souligner que les primates peuvent également influencer la composition des forêts de diverses manières. Par exemple, en se nourrissant préférentiellement des feuilles et/ou de l'écorce de certaines espèces d'arbres, ils peuvent ralentir la croissance de ces espèces de plantes abondamment consommées, voire même les tuer, au point que les espèces végétales non-préférées

prennent alors le dessus. A l'inverse, ils peuvent se nourrir d'espèces de plantes et ainsi augmenter la productivité et l'abondance de ces dernières (Chapman *et al.*, 2013). Par exemple, les plantes consommées par les gorilles de montagne (*Gorilla beringei beringei*) présentent des taux de croissances supérieurs par rapport aux plantes non-consommées (Watts, 1987). De plus, certains primates, souvent de petite taille (ex : *Eulemur*, *Cebus*, *Saguinus*), jouent un rôle dans la pollinisation de certaines espèces de plantes (Heymann, 2011). Toutefois, en surexploitant les fleurs de certaines plantes, les primates peuvent limiter la production de fruits et donc le recrutement de ces espèces. Finalement, les primates peuvent aussi influencer les cycles des nutriments au sein des forêts (ex : amélioration de la qualité des sols où les primates défèquent) (Chapman *et al.*, 2013).

La contribution des primates à la dispersion des graines est étudiée depuis les années 80, et le nombre d'études sur le sujet a connu un boom considérable lors des deux dernières décennies (Razafindratsima *et al.*, 2018). Les primates représentent une biomasse conséquente au sein des forêts tropicales (Chapman, 1995) et de récentes études mettent en évidence le rôle majeur qu'ils jouent dans la dispersion des graines (Razafindratsima *et al.*, 2018), essentiellement en avalant et déféquant les graines intactes ou en les laissant tomber au sol (Albert *et al.*, 2013). Citons à titre d'exemples certains groupes de primates jouant un rôle dans la dispersion des graines : les gibbons (*Hylobates* spp.), les gorilles des plaines de l'ouest (*Gorilla g. gorilla*), les tamarins (genres *Saguinus* et *Leontocebus*), les lémuriens (genres *Eulemur* et *Varecia*), les singes hurleurs (*Alouatta* spp.) ou encore les macaques (*Macaca* spp.) (McConkey, 2000; Amato & Estrada, 2010; Culot *et al.*, 2010; Albert *et al.*, 2013; Razafindratsima *et al.*, 2014; Petre *et al.*, 2015).

Détruisant la majorité des graines qu'ils consomment, certains primates, tels que les colobinés (en Asie et Afrique) et les pitheciinés (en Amérique), sont, quant à eux, généralement considérés comme des prédateurs de graines (Norconk *et al.*, 1998). Toutefois, plusieurs études suggèrent que ces « prédateurs » pourraient aussi disperser certaines graines : en les déféquant (Matsuda *et al.*, 2013b; Tsuji *et al.*, 2017), en les séparant de la pulpe et en les laissant tomber au sol (Barnett *et al.*, 2012) ou encore par épizoochorie (Chen *et al.*, 2018). De fait, à l'égard des primates, la dichotomie « disperseur-prédateur » semble trop simpliste et mériterait d'être revue (Norconk *et al.*, 1998), puisqu'en réalité les primates peuvent influencer différemment le devenir des graines en fonction des espèces de plantes qu'ils consomment ou de la période de l'année considérée (Garber & Lambert, 1998).

La dispersion des graines assurée par les primates est un processus écologique crucial, tant pour le maintien des forêts existantes que pour la régénération des futures forêts (restauration des habitats) (Chapman & Dunham, 2018). Il est dès lors temps de s'inquiéter de leur devenir, face au constat désolant publié par Estrada *et al.* (2017), précisant que près de 60% des espèces de primates sont actuellement menacées d'extinction et que 75% des populations déclinent dans la nature. L'Asie obtient la deuxième place sur le « podium », après Madagascar ; 73% des espèces de primates y sont menacées d'extinction et 95% des populations sont en déclin (Figure 7). L'homme est responsable de ce désastre. La principale menace qui pèse sur les primates est la perte de leurs habitats, par l'expansion des terres agricoles

industrielles et des élevages, l'exploitation forestière, les mines, les forages (gaz et pétrole) ou encore la construction de nouvelles routes. Le braconnage pour la viande de brousse, le trafic illégal d'animaux, les changements climatiques, ainsi que les maladies d'origine humaine sont également des pressions importantes qui pèsent de plus en plus sur les primates à travers le monde. Finalement, les guerres civiles et crises politiques dans certains pays (ex : RDC) amplifient souvent les problèmes (Estrada *et al.*, 2017).

Dépendants des forêts, principalement arboricoles, et sensibles aux changements des structures forestières, les primates sont très vulnérables face à la perte et à la dégradation des forêts tropicales (Almeida-Rocha *et al.*, 2017) et répondent différemment aux modifications des habitats, en fonction de leur écologie (Schwitzer *et al.*, 2011; Almeida-Rocha *et al.*, 2017). De plus, les primates sont caractérisés par des taux de reproduction faibles (ex : maturité sexuelle tardive, fertilité faible, soins parentaux longs) (Jones, 2011), les rendant vulnérables aux modifications des conditions environnementales (Estrada *et al.*, 2017).

1.2 L'île de Bornéo : Biodiversité menacée

1.2.1 Introduction

Constituant la troisième plus grande île du monde, après le Groenland et la Nouvelle-Guinée, Bornéo (74 Mha) est située dans la région équatoriale de l'océan pacifique, en Asie du sud-est (Figure 8a) (Rautner *et al.*, 2005). Elle jouit d'un climat tropical humide, où les températures sont constantes et élevées toute l'année ($\sim 25-35^{\circ}\text{C}$), et les pluies abondantes (précipitations mensuelles généralement ≥ 200 mm) (MacKinnon *et al.*, 1996). Trois entités se partagent l'île de Bornéo. Le nord se compose des états malaisiens de Sabah et Sarawak (~ 20 Mha) et du Sultanat indépendant de Brunei (0,6 Mha). La majeure partie de l'île appartient à l'Indonésie, c'est le Kalimantan (> 50 Mha). Ce dernier se subdivise en quatre provinces administratives : le Kalimantan occidental, oriental, central et du sud (Figure 8b) (Rautner *et al.*, 2005).

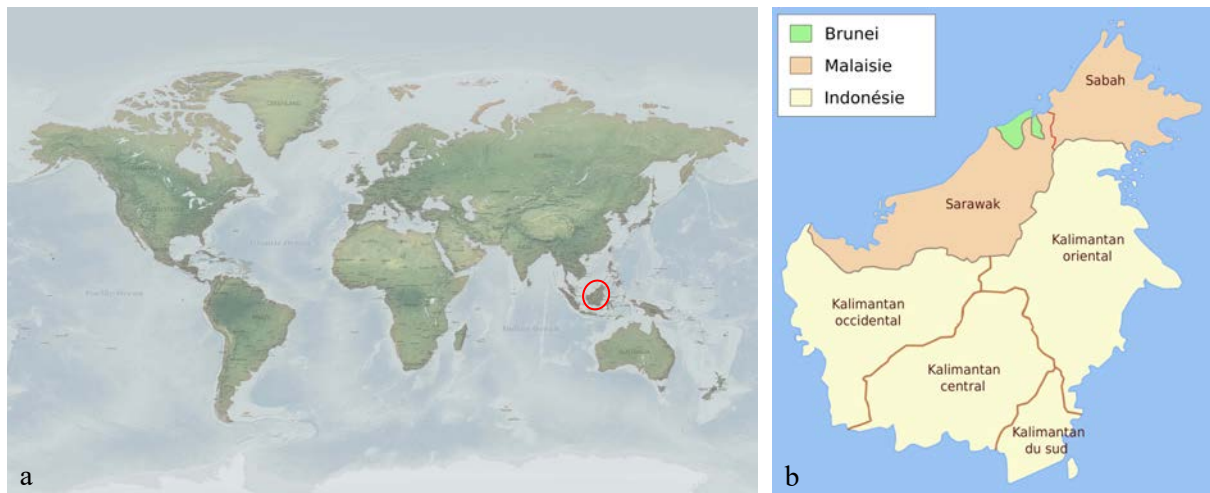


Figure 8. a) Localisation de l'île de Bornéo (encadrée en rouge) en Asie du sud-est (© Map Republic) ; b) Carte administrative de l'île de Bornéo (© wikimedia commons)

1.2.2 Hotspot de biodiversité

L'île de Bornéo se situe dans l'ensemble biogéographique appelé Sundaland, une région d'une superficie d'150 Mha englobant plus de 17 000 îles réparties de part et d'autre de l'équateur, entre l'Asie continentale et l'Australie. Le Sundaland se situe sur le plateau continental de Sunda, une extension du continent asiatique, incluant également la péninsule malaysienne, les îles de Java, Sumatra et Bornéo (Figure 9) (Whitten *et al.*, 2004). Le niveau de la mer y est relativement bas (-120 à 0 m), fluctuant avec la fonte des calottes polaires. Au cours des derniers 800 000 ans, le niveau de la mer était la plupart du temps inférieur à -30 m (ex : périodes glaciaires) ; les terres de Bornéo, Java, Sumatra et la Malaisie continentale étaient alors connectées les unes aux autres. Actuellement, Bornéo vit l'une de rares périodes insulaires de son histoire (Phillipps & Phillipps, 2016).

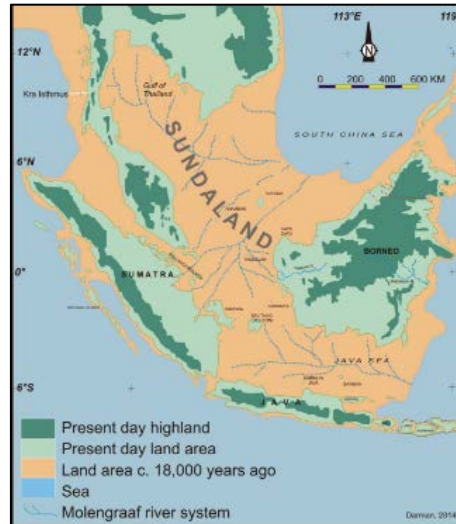


Figure 9. Localisation du Sundaland sur le plateau continental de Sunda (en orange) (Darman, 2014)

En raison des innombrables espèces endémiques qu'elle abrite et des menaces qui pèsent sur ses habitats, la région du Sundaland, incluant l'île de Bornéo, est considérée comme un hotspot de biodiversité, c'est-à-dire une zone d'importance prioritaire en matière de conservation (Figure 10) (Myers *et al.*, 2000). Recouvrant 1% de la surface du globe, l'île de Bornéo abrite 6% de la faune et de la flore terrestres (WWF, 2017). Arborant la plus vaste étendue de forêt tropicale d'Asie du sud-est, Bornéo est l'un des habitats les plus riches de la Terre. La diversité végétale de l'île est très élevée, puisqu'on y dénombre entre 10 000 et 15 000 espèces de plantes à fleurs. Plus de 3 000 espèces d'arbres y sont recensées, dont de nombreuses espèces de diptérocarpes très prisées pour le bois de construction. L'île constitue également le foyer d'une diversité remarquable de vertébrés : 222 espèces de mammifères et 420 espèces d'oiseaux y résident. Elle comprend également de nombreuses espèces de poissons d'eaux douces, de reptiles, d'amphibiens et d'invertébrés. Le degré d'endémisme y est important : un tiers des plantes, 44 espèces de mammifères et 37 espèces d'oiseaux ne se retrouvent que sur cette île (MacKinnon *et al.*, 1996).

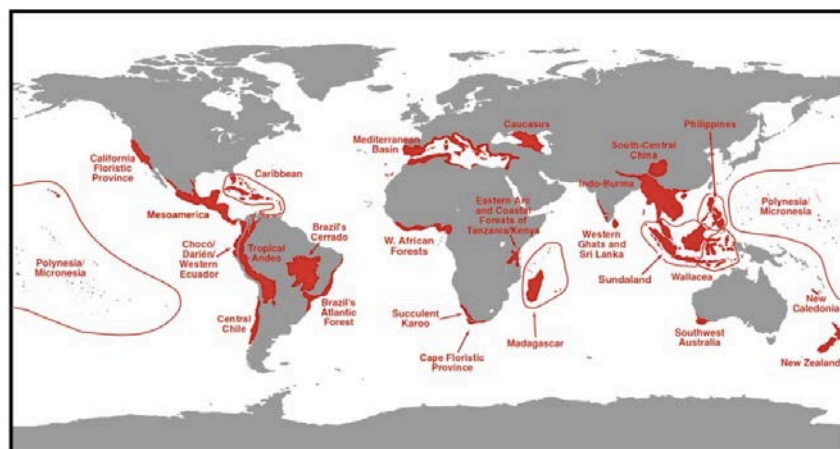


Figure 10. Distribution des 25 hotspots de biodiversité sur Terre (Myers *et al.*, 2000)

Outre la présence d'espèces de mammifères iconiques et menacées d'extinction, telles que l'éléphant de Bornéo (*Elephas maximus borneensis*) et le rhinocéros de Sumatra (*Dicerorhinus sumatrensis*) (Wich *et al.*, 2015), l'île de Bornéo constitue également un hotspot de diversité pour les espèces de primates, avec 13 espèces identifiées (Figure 11), dont huit sont endémiques à l'île⁴ (Meijaard & Nijman, 2003). L'effectif des populations de primates de l'île de Bornéo diminue au fil des ans. La plupart des espèces sont d'ailleurs considérées comme « En danger critique » (n=2), « En danger » (n=3), ou « Vulnérable » (n=5), selon les critères de l'UICN (IUCN, 2019).



Figure 11. Illustration des 13 espèces de primates rencontrées sur l'île de Bornéo: a) *Pongo pygmaeus*, b) *Nasalis larvatus* ; c) *Hylobates muelleri*, d) *Hylobates agilis*, e) *Presbytis chrysomelas*, f) *P. hosei*, g) *P. frontata*, h) *P. rubicunda*, i) *Trachypithecus cristatus*, j) *Macaca nemestrina*, k) *M. fascicularis*, l) *Nycticebus menagensis*, m) *Tarsius bancanus*

⁴ En suivant la classification taxonomique de Groves (2001) (Meijaard & Nijman, 2003)

1.2.3 Enjeux majeurs et priorité en terme de conservation

1.2.3.1 Déforestation: forêts vs. palmiers

Depuis le début des années 70, les forêts de Bornéo sont sujettes à des pressions anthropiques à grande échelle et sans précédent, telles que le déboisement sélectif, les feux ou encore la conversion des forêts en plantations (essentiellement de palmiers à huile, mais aussi d'acacia et d'arbres à caoutchouc) (Gaveau *et al.*, 2014). Alors qu'en 1973 les forêts intactes recouvraient près de 76% de la superficie de l'île, soit ~ 56 Mha (Figure 12a), on estime qu'entre 1973 et 2015, 34% du couvert forestier de l'île a disparu (~ 19 Mha) (Gaveau *et al.*, 2016); 97% de cette déforestation s'étant produite dans les zones de basse altitude (< 500 m asl.), faciles d'accès (Gaveau *et al.*, 2014). En 2015, les plantations de monocultures industrielles à large échelle représentaient 12% de la surface de l'île de Bornéo (Gaveau *et al.*, 2016) (Tableau 1).

Tableau 1. Statuts des surfaces de l'île de Bornéo entre 1973 et 2080

Statut	Année	Surface (Mha)	Proportion de l'île (%)	Sources
Surface totale de l'île	/	74	100	(Rautner et al. 2005)
Couvert forestier	1973	56	76	(Gaveau et al. 2014, 2016)
Couvert forestier	2010	39	53	(Gaveau et al. 2014)
Couvert forestier	2015	37	51	(Gaveau et al. 2016)
Plantations	2015	9	12	(Gaveau et al. 2016)
Forêts protégées	2017	12	16	(Scriven et al. 2015, WWF 2017)
Couvert forestier (estimations)	2020	36	49	(Wich et al., 2015)
	2050	26	35	
	2080	16	22	

Les taux de déforestation sur l'île de Bornéo ont quasiment été deux fois plus élevés que dans les autres forêts tropicales humides du monde. Toutefois, ils diffèrent d'une région à l'autre de l'île : plus élevés à Kalimantan et Sabah, qu'à Sarawak et Brunei (Gaveau *et al.*, 2014). Au départ, l'extraction de bois d'œuvre à usage commercial était le principal moteur de déforestation sur l'île (Wich *et al.*, 2015). En effet, entre 1980 et 2000, les volumes de bois de diptérocarpes exportés depuis Bornéo étaient plus importants que les exports combinés de bois issus des forêts tropicales amazoniennes et africaines (Curran *et al.*, 2004). Aujourd'hui, c'est la conversion forestière vers des plantations en monoculture qui a pris le pas (Wich *et al.*, 2015). Par exemple, dans la partie malaisienne de Bornéo (Sabah et Sarawak), on observe que plus de 57% des surfaces déboisées au cours des quatre dernières décennies ont été converties en plantations (Gaveau *et al.*, 2016).

Puisque la majorité des zones appropriées à l'établissement des monocultures de palmiers à huile ont déjà été converties à cet usage, l'expansion des futures plantations se fera désormais aux dépens de zones moins adaptées (ex : collines) (Hai *et al.*, 2001). En se basant sur des modèles prédictifs (basés sur l'extrapolation des taux de déforestation), Wich *et al.* (2015) annoncent un futur sombre pour la couverture forestière de Bornéo. Ils estiment que 3,2 Mha de forêt auront disparu en 2020, 12,9 Mha en 2050, et 22,6 Mha à l'horizon 2080 (Figure 12b, Tableau 1).

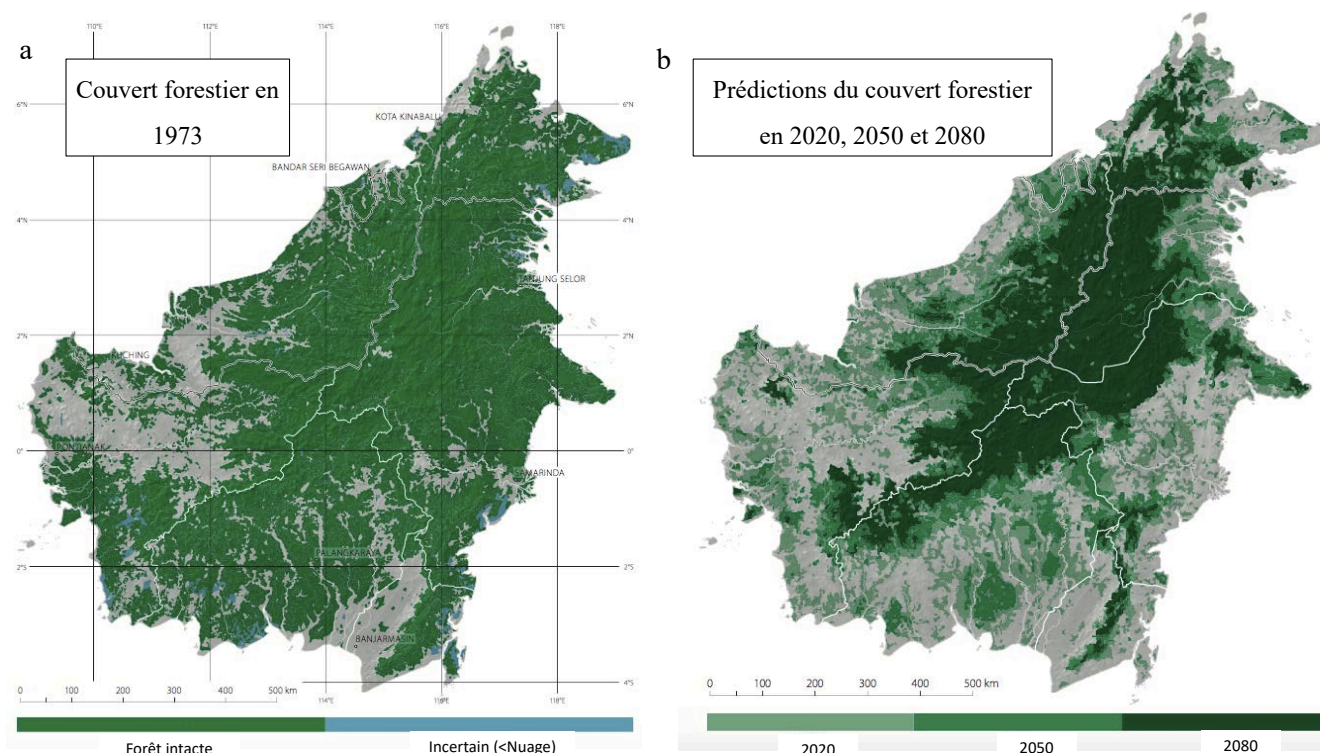


Figure 12. Cartes illustrant a) le couvert forestier sur l'île de Bornéo en 1973 (en vert), et b) les prédictions du couvert forestier en 2020 (vert clair), 2050 (vert), et 2080 (vert foncé) (Wich *et al.*, 2015)

1.2.3.2 Menaces pour la faune et la flore

Outre la diminution considérable des surfaces forestières de l'île de Bornéo résultant de la conversion des forêts en zones agricoles, d'autres pressions anthropiques pèsent également sur la biodiversité de l'île. Les feux de forêt, essentiellement dans les tourbières et les forêts de basse altitude, menacent considérablement la biodiversité de l'île. Ces feux sont souvent d'origine criminelle et destinés à ouvrir les zones forestières à des fins de plantation (WWF, 2017).

La chasse, mais surtout le braconnage d'espèces protégées, ont aussi un impact majeur sur la faune sauvage de l'île, affectant négativement la densité des populations animales. A Sarawak et Sabah (Malaisie), plusieurs millions d'animaux sont tués chaque année pour la viande de brousse (Bennett *et al.*, 2000). Dans ces États, le braconnage est notamment responsable d'une diminution de plus de 30% de la richesse des espèces mammaliennes et constitue une menace considérable pour les primates (Brodie *et al.*, 2015).

Une gestion inadéquate des terres peut aussi mener à l'allocation incorrecte des espaces naturels (ex : délivrance de permis d'exploitation dans des zones d'intérêt environnemental abritant des espèces endémiques) (WWF, 2017). Par exemple, entre 2000 et 2010, un quart des terres du Kalimantan allouées aux concessions forestières virent leur statut changer et furent allouées à l'établissement de plantations de palmiers à huile, permettant alors leur conversion (Gaveau *et al.*, 2013). De plus, depuis peu, une nouvelle menace pèse sur les populations animales du Kalimantan oriental : la probable délocalisation de la capitale Indonésienne (Djakarta) depuis l'île de Java vers l'île de Bornéo, à proximité des villes de Balikpapan et Samarinda (Kalimantan oriental) (Gokkon, 2019). Les environnementalistes craignent que ce projet de délocalisation, bien qu'il doive encore être approuvé par le parlement, entraîne des déboisements massifs pour permettre l'installation de l'ensemble des infrastructures urbaines (Reuters AP, 2019). Ces craintes ne sont pas infondées. Une étude récente met notamment en évidence l'impact écologique néfaste des projets (en cours ou futurs) d'expansion des routes et chemins de fer au sein du Kalimantan. Selon cette dernière, ces réseaux d'infrastructures seront à l'origine de la dégradation de larges étendues de forêts encore intactes, aux conséquences délétères : importante fragmentation du paysage, augmentation des zones de lisières, augmentation de la perméabilité des forêts par l'homme et diminution de la connectivité entre les zones forestières. Pas moins de 42 aires protégées seront affectées par ces projets ; davantage accessibles, elles seront sujettes à des risques plus élevés d'intrusion et de braconnage (Alamgir *et al.*, 2019). Dès lors, il nous paraît raisonnable de craindre que la construction d'une capitale, pôle d'un réseau routier rayonnant, aura des répercussions très négatives sur les forêts et la faune du Kalimantan oriental.

Finalement, les changements climatiques (ex : l'augmentation des températures annuelles, la modification de la distribution des précipitations) menacent également la biodiversité mondiale, et donc celle de l'île de Bornéo. Un rapport récent met notamment en évidence l'impact dévastateur des changements climatiques et de la modification des habitats sur la future distribution des populations d'orangs-outans, *P. pygmaeus*, prédisant une diminution de plus de 68% des habitats appropriés pour l'espèce (Wich *et al.*, 2015).

1.2.3.3 État de la conservation à Bornéo : les aires protégées

Face au constat des nombreuses menaces qui pèsent sur la biodiversité terrestre, des efforts de conservation sont indispensables. Les aires protégées constituent l'approche la plus efficace dans le domaine de la conservation de la biodiversité. Néanmoins, la plupart des aires protégées font face à des pressions anthropiques conséquentes, telles que la réduction de leurs habitats ou la surexploitation de leurs ressources (European Commission, 2018). A Bornéo, les écosystèmes forestiers représentent près de la moitié de la surface de l'île et seuls 31% de ces forêts disposent d'un statut de protection (Tableau 1, Figure 13), c'est-à-dire approximativement un sixième de la surface totale de l'île (Scriven *et al.*, 2015; WWF, 2017). Ces aires protégées sont fortement isolées – donc peu connectées – notamment dans les zones de basse altitude (Curran *et al.*, 2004; Proctor *et al.*, 2011; Scriven *et al.*, 2015). Mais surtout,

leur statut de protection ne suffit souvent pas face aux pressions anthropiques. Une étude montre en effet qu'à Kalimantan, les aires protégées de basse altitude ont subi un déclin de 56% de 1985 à 2001, s'accompagnant d'une dégradation des zones tampons qui les entourent (Curran *et al.*, 2004).

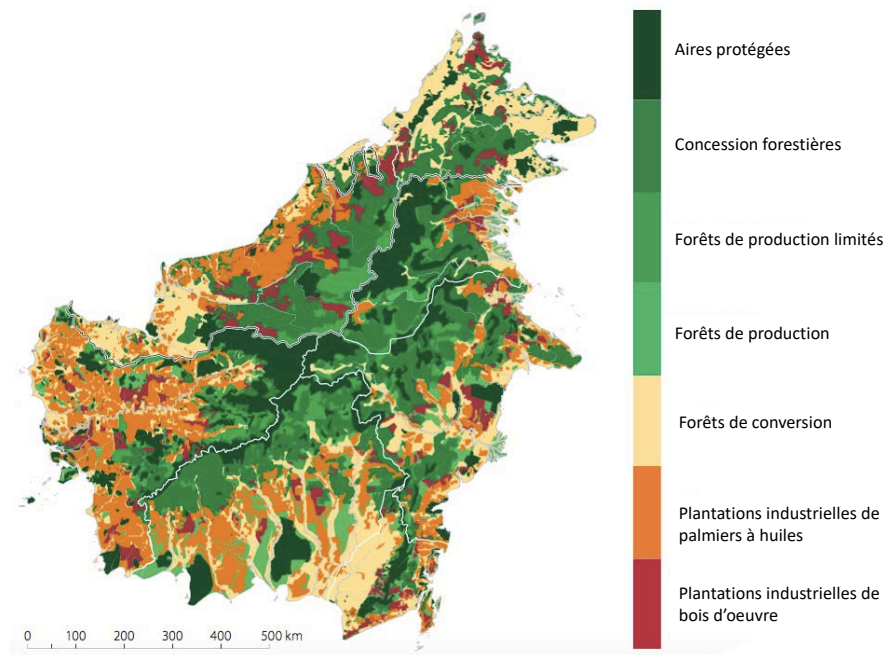


Figure 13. Distribution des aires protégées (vert foncé) et des autres types d'allocations des terres sur l'île de Bornéo (Wich *et al.*, 2015)⁵

⁵ La majeure partie des « forêts de conversion » à Sabah sont aujourd'hui des plantations industrielles de palmiers à huile (Wich *et al.*, 2015).

1.3 Objectifs et structure de la thèse

1.3.1 Contexte du projet de recherche et objectifs généraux

On l'a vu, la biodiversité mondiale est en péril, essentiellement dans les régions tropicales (Dirzo *et al.*, 2014). Les principales pressions responsables de ce déclin de biodiversité terrestre sont, sans surprise, d'origine anthropique, telles que la conversion et la dégradation des habitats (Newbold *et al.*, 2015). L'Asie du sud-est est particulièrement touchée, puisqu'on y recense les taux les plus élevés de déforestation au sein des tropiques (Sodhi *et al.*, 2004) ; et l'île de Bornéo n'est pas en reste. En effet, l'île subit des diminutions de couvert forestier sans précédent depuis les années 1970, engendrées par les déboisements sélectifs, les feux ou encore la conversion des terres en plantations agricoles de grande échelle (notamment, de palmiers à huile) (Gaveau *et al.*, 2014). Les monocultures de palmiers à huile fragmentent les paysages et constituent de réelles barrières pour les déplacements de nombreuses espèces animales (Scriven *et al.*, 2017), comme les primates.

Hotspot de biodiversité, l'île de Bornéo n'abrite pas moins de 13 espèces de primates ; 10 d'entre elles – dont le nasique, *Nasalis larvatus*, sujet de notre étude – sont menacées d'extinction (IUCN, 2019). A Sabah (État du nord-est de Bornéo), les populations de nasiques – estimées à un total de 5 900 individus – sont fortement fragmentées et décroissent. Il est dès lors urgent que des mesures de conservation soient mises en place pour palier ce déclin (Sha *et al.*, 2008). Dans la région Kinabatangan (notre site d'étude, à Sabah), la conservation de *N. larvatus* ne pourra être assurée que par la mise en place de nouvelles zones protégées le long du fleuve Kinabatangan et l'établissement de corridors permettant de relier les divers fragments forestiers (Boonratana, 2013). Dès lors, de bonnes connaissances sur l'écologie du nasique sont fondamentales pour assurer sa protection dans cet écosystème fortement dégradé. C'est dans ce contexte que s'intègre notre projet de doctorat qui vise à mieux comprendre l'écologie, notamment alimentaire, d'une espèce menacée, *Nasalis larvatus*, au sein du paysage fragmenté de la région Kinabatangan, à Sabah.

Des données sociales [ex : taille de la population et des groupes sociaux (Matsuda *et al.*, 2018)] et spatiales [ex : utilisation de l'habitat, domaines vitaux, sélection des sites dorts, etc. (Thiry *et al.*, 2016; Stark *et al.*, 2017b; Stark, 2018)] sont disponibles dans notre site d'étude ; en revanche certaines données, notamment alimentaires, faisaient encore défaut. En effet, bien que de précédentes études se soient intéressées au régime alimentaire du nasique, tant dans les mangroves, que dans les forêts marécageuses ou riveraines, elles étaient soit spatialement et temporellement limitées⁶, soit axées sur le suivi journalier d'un unique groupe social (Salter *et al.*, 1985; Bennett & Sebastian, 1988; Yeager, 1989; Boonratana, 2000; Matsuda *et al.*, 2009b). De plus, aucune donnée alimentaire n'était à ce jour disponible dans notre site d'étude [les lots 5,6 et 7 du *Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary* (LKWS),

⁶ Observations comportementales des groupes de nasiques à leurs sites dorts en bordure de fleuve, à l'aube et au crépuscule

(Figure 22)]. Enfin, si la contribution de certains primates au processus écologique de régénération des forêts tropicales (dispersion des graines) a été mise en évidence à maintes reprises (Chapman & Dunham, 2018), il n'en était rien pour les colobinés – dont le nasique – jusque récemment (McConkey, 2018). Par conséquent, notre travail de recherche s'articule plus spécifiquement autour de deux objectifs principaux. Nous détaillons ci-dessous les diverses activités de recherche mises en place pour chacun d'eux.

Objectif n°1. Identifier les espèces végétales-clés pour le nasique dans les forêts riveraines du *LKWS*

- Établir une liste exhaustive des espèces de plantes consommées par les nasiques, en utilisant deux méthodes de collecte de données (observations directes et *DNA metabarcoding*)
- Étudier la composition nutritionnelle d'espèces végétales-clés consommées par les nasiques
- Évaluer la variation saisonnière du régime alimentaire, en analysant la taille des particules fécales (proxy de l'efficacité de mastication).

Objectif n°2. Évaluer le rôle que joue le nasique dans la dispersion des graines le long du fleuve Kinabatangan.

- Identifier les espèces de plantes dont les graines sont dispersées par les nasiques dans le *LKWS*
- Déterminer l'impact du nasique sur la germination des graines de *Nauclea* spp., abondamment retrouvées dans les fèces des individus
- Étudier les interactions entre la communauté animale du *LKWS* et l'espèce d'arbre *Nauclea orientalis*

1.3.2 Structure de la thèse

Cette thèse de doctorat débute par **l'introduction générale (chapitre 1)** dans laquelle nous mettons en évidence le contexte général de crise mondiale de la biodiversité et de la perte des habitats forestiers. Nous présentons également le cas de l'île de Bornéo et la problématique des plantations en monocultures. Dans le **chapitre 2**, nous présentons ensuite l'espèce *Nasalis larvatus* sur laquelle notre recherche s'est concentrée, le site d'étude – la région Kinabatangan et le *LKWS* – dans lequel nous avons entrepris notre recherche, ainsi que les méthodologies générales mises en place pour mener à bien ce projet. Ensuite, la thèse se poursuit par plusieurs chapitres qui reprennent les résultats des différentes activités de recherche mentionnées ci-dessus. La Figure 14 représente le cadre conceptuel de notre projet de doctorat, organisé en différents chapitres, selon les deux objectifs généraux et les activités de recherche.

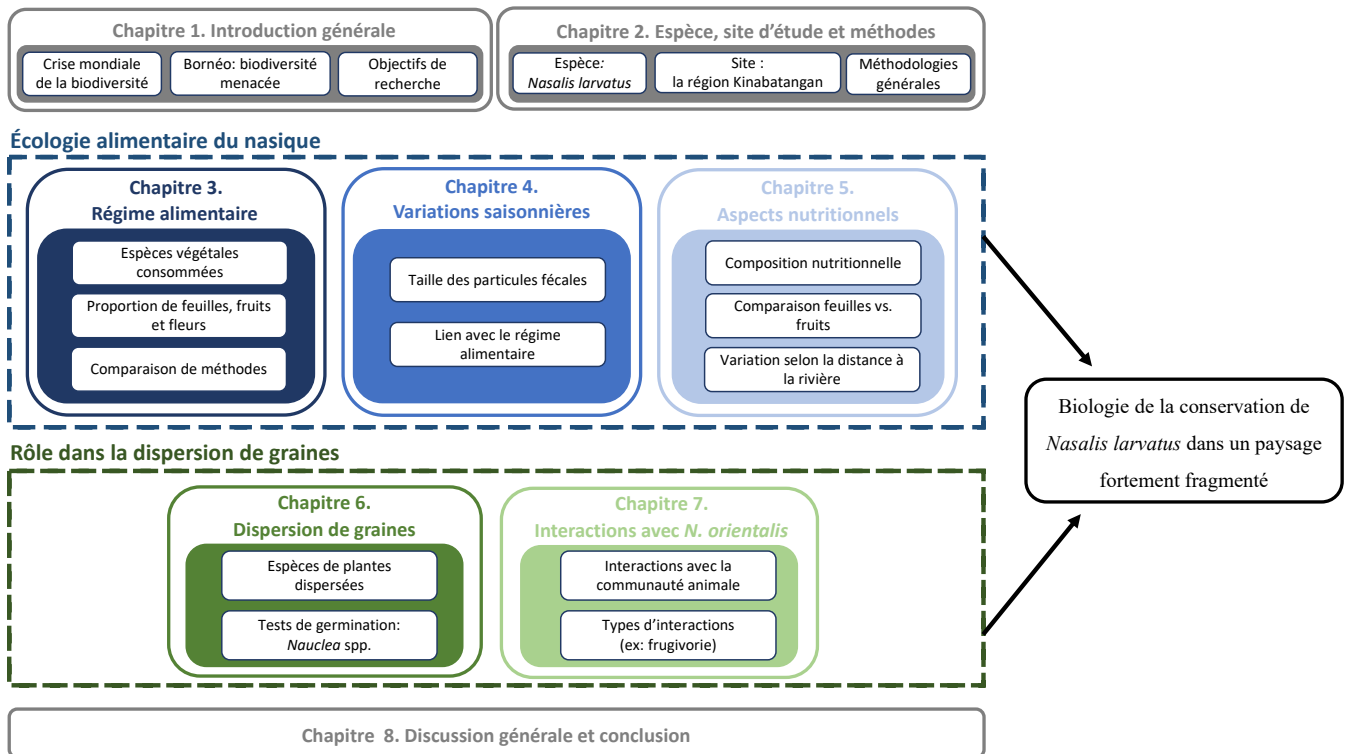


Figure 14. Cadre conceptuel de la thèse

A l'exception des chapitres 1, 2 et 8 qui sont rédigés en français, les chapitres de cette thèse sont rédigés en anglais, sous la forme d'articles scientifiques publiés, soumis, ou en préparation. Nous les détaillons ci-dessous.

Chapitre 3. Régime alimentaire de *Nasalis larvatus*

Ce chapitre correspond à un article en préparation. Il est le résultat d'une collaboration avec le Professeur Olivier Hardy du département d'Écologie Biologique et Évolutive (EBE), de l'Université libre de Bruxelles (ULB, Belgique). Dans ce chapitre, nous identifions les espèces végétales consommées par les nasiques dans le *LKWS*, à l'aide de deux méthodes (les observations directes et le *DNA metabarcoding*) et soulignons l'importance de prendre en considération certaines espèces végétales dans les programmes de restauration du *LKWS*.

Chapitre 4. Variations saisonnières de la taille des particules fécales chez *Nasalis larvatus*

Ce chapitre correspond à un article publié dans la revue *Folia Primatologica*. Il est le résultat d'une collaboration avec le Professeur Marcus Clauss de la *Clinic for Zoo Animals, Exotic Pets and Wildlife*, de l'Université de Zurich (UZH, Suisse). Ici, nous nous intéressons à la variation saisonnière de la taille des particules fécales (MPS) chez le nasique. La MPS est une mesure souvent utilisée pour étudier l'efficacité de mastication chez les mammifères herbivores.

Chapitre 5. Aspects nutritionnels des aliments consommés par *Nasalis larvatus*

Ce chapitre correspond à un article en préparation, résultant d'une collaboration avec le Professeur Charles S. Vairappan de l'*Institute for Tropical Biology and Conservation (ITBC)*, de l'*Universiti Malaysia Sabah (UMS, Malaisie)*. Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la variation de la composition nutritionnelle et minérale de 10 espèces de plantes abondamment consommées par les nasiques dans notre site d'étude (voir chapitre 3).

Chapitre 6. Dispersion des graines par *Nasalis larvatus*

Ce chapitre correspond à un article publié dans la revue *Primates*, résultant d'une étude que nous avons réalisée avec Oriana Bhasin, dans le cadre de son mémoire de Master 2 (ULB 2016-2017). Ici, nous nous intéressons à la présence de graines dans les fèces de nasiques, et décrivons les tests de germination que nous avons mis en place pour comparer le succès de germination des graines de *Nauclea* spp. déféquées par les nasiques à celui des graines issues des fruits de l'espèce *Nauclea orientalis*.

Chapitre 7. Interactions entre la communauté animale et *Nauclea orientalis*

Ce chapitre reprend également les résultats d'une étude que nous avons réalisée avec Oriana Bhasin [mémoire de Master 2, ULB (2016-2017)]. Il correspond à un article en préparation. À l'aide de camera traps et d'observations directes par bateau, nous évaluons les interactions entre la communauté animale du *LKWS* et l'espèce d'arbre *Nauclea orientalis* abondante le long du fleuve Kinabatangan. Finalement, nous soulignons l'importance des recherches sur les interactions animaux-plantes, particulièrement dans des paysages fragmentés, comme le *LKWS*.

Le chapitre 8 aborde la discussion générale et la conclusion de notre étude. Nous y présentons les principales découvertes de l'étude et proposons des pistes de recherches futures. Finalement, nous y développons les principaux enjeux de conservation pour *N. larvatus* dans le *LKWS* et à Sabah et proposons plusieurs mesures de conservation qui mériteraient d'être mises en place pour assurer la survie de l'espèce dans cette région fragmentée.

En annexes, nous avons intégré plusieurs tableaux, figures, activités et illustrations qui ne sont pas repris dans les articles/chapitres précédents. Comme décrit dans la partie « 2.3. Méthodologies générales », nous avons essentiellement collecté nos données le long du fleuve Kinabatangan, où les nasiques sélectionnent leurs sites dorts. Dès lors, nous avons intégré dans les annexes un article, publié dans la revue *Folia Primatologica*, décrivant la sélection des sites dorts par les groupes de nasiques, sujet de notre travail de mémoire (ULB, 2011-2012).

2 Sujet, site d'étude et méthodologies générales



2.1 Sujet d'étude : *Nasalis larvatus* (Wurmb, 1787)

2.1.1 Phylogénie et description de l'espèce

Class : Mammifères

Ordre : Primates

Sous-ordre : *Haplorrhini*

Infra-ordre : Simiiformes

Clade : *Catarrhini*

Famille : *Cercopithecidae*

Sous-famille : *Colobinae*

Tribu : *Presbytini*

Genre : *Nasalis*

Espèce : *Nasalis larvatus*

Le nasique, *Nasalis larvatus*, est une espèce de primate catarrhinien endémique à l'île de Bornéo. Il appartient à la famille des *Cercopithecidae* et à la sous-famille des *Colobinae*. La famille des *Cercopithecidae*, ou « singes de l'Ancien monde », présente une richesse spécifique remarquable puisqu'elle regroupe 23 genres et 159 espèces de primates d'Afrique et d'Asie. Les colobinés, aussi appelés les « primates folivores », sont représentés par 9 genres et 78 espèces ; *N. larvatus* étant la seule espèce au sein du genre *Nasalis* (Mittermeier & Rylands, 2013). Deux sous-espèces ont été décrites : *Nasalis larvatus larvatus* (Wurmb, 1787) et *N. l. orientalis* (Chasen, 1940). Cependant, elles se différencient peu l'une de l'autre (Figure 15). De plus, *N. l. orientalis*, dont la distribution est restreinte au nord-est du Kalimantan (partie Indonésienne de Bornéo, voir Figure 8b), n'est pas reconnue par la totalité des autorités (Meijaard *et al.*, 2008). De fait, les études qui concernent le nasique se réfèrent généralement à l'espèce *Nasalis larvatus*, sans distinguer les deux sous-espèces ; nous ferons de même tout au long de ce manuscrit.

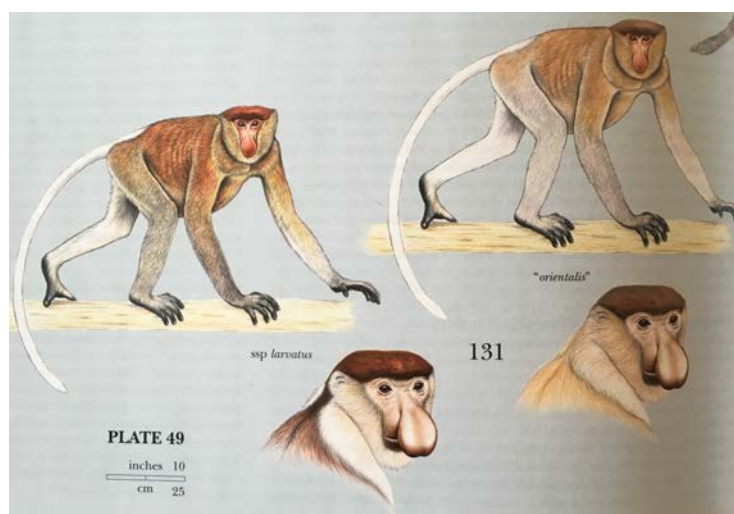


Figure 15. Illustration présentant *Nasalis larvatus* spp. *larvatus* et *N. l. spp. orientalis* (© Stephen Nash, Mittermeier & Rylands 2013)

Plusieurs synonymes de *N. larvatus* existent : *Cercopithecus larvatus* (von Wurmb, 1787), *Nasalis capistratus* (Kerr, 1792), *N. nasica* (Lacépède, 1799) ou encore *N. recurvus* (Vigors and Horsfield, 1828) (Meijaard *et al.*, 2008; Mittermeier & Rylands, 2013). Toutefois, la littérature scientifique se réfère essentiellement à *N. larvatus* pour cette espèce. Le nasique se traduit en anglais par *proboscis monkey* ou *long-nosed monkey*⁷ (Mittermeier & Rylands, 2013). En malais et indonésien, nasique se dit *bangkatan* [comm. pers.], *bekantan* (Meijaard & Nijman, 2000b) ou encore *orang belanda* (littéralement « homme néerlandais ») (Bennett, 1986); il tire son nom de l'imposant nez des mâles adultes (Oates *et al.*, 1994) (Figure 16).



Figure 16. Illustration d'un nasique dans la bande dessinée "Les aventures de Tintin. Vol 714 pour Sydney" (© Hergé, 1968).

N. larvatus est la plus grande espèce de colobinés (Oates & Davies, 1994) et est caractérisée par un remarquable dimorphisme sexuel (Schultz, 1942). En effet, les mâles adultes pèsent en moyenne 20-24 kilos, soit près du double des femelles (~ 10 kg) (Mittermeier & Rylands, 2013). Ils sont également de plus grande taille (74,5 cm) que ces dernières (62 cm) (Sha *et al.*, 2011). De plus, alors que le nez des femelles est court et droit, les mâles dominants présentent quant à eux un appendice nasal proéminent et pendant, très caractéristique. Les nasiques arborent généralement un pelage brun-roux avec un collier de poils plus clair autour du cou, des pattes grises, une queue blanche ou grise (selon le sexe) et un faciès rose (chez les adultes) ou noirâtre-grisâtre (chez les jeunes). La couleur du pelage varie également entre les sexes. Les femelles présentent un pelage relativement uniforme ainsi qu'une fine queue grisâtre, plus courte que celle des mâles. Ces derniers sont généralement plus sombres que les femelles mais présentent un collier de poils jaunâtres autour du cou bien plus distinct que celui des femelles. De plus, ils présentent une queue plus longue et épaisse que celle des femelles, arborant un pelage blanc très distinct, tout comme l'est le bas de leurs dos (Figure 17) (Sha *et al.*, 2011; Mittermeier & Rylands, 2013).

⁷ En anglais 'proboscis' signifie 'trompe', 'long-nosed' signifie 'au long nez', et 'monkey' signifie 'singe'.



Figure 17. Photographies a) d'une femelle nasique adulte avec un jeune, et b) d'un mâle adulte (© Rudi Delvaux)

2.1.2 Distribution géographique de l'espèce et principaux habitats

Endémique à l'île de Bornéo, l'espèce *N. larvatus* est présente dans l'ensemble des entités administratives qui constituent l'île : la Malaisie (Sabah et Sarawak), Brunei et l'Indonésie (Kalimantan), ainsi que sur les îles de Sebatik et Laut, adjacentes à Bornéo (Mittermeier & Rylands, 2013). Les populations de nasiques sont essentiellement présentes à proximité des zones côtières, généralement à moins de 50 km des côtes, ainsi que le long des cours d'eau (Sha *et al.*, 2011). Le nasique est majoritairement restreint à certains habitats de basse altitude (< 350 m), tels que les forêts riveraines, mangroves et forêts marécageuses (Bennett, 1986; Meijaard & Nijman, 2000a; Meijaard *et al.*, 2008), habitats facilement accessibles à l'homme et dès lors fortement sujets aux pressions anthropiques (Sha *et al.*, 2011; Gaveau *et al.*, 2014). De fait, la répartition géographique de l'espèce sur l'île est fortement fragmentée (Figure 18b) et bien loin de la répartition géographique théorique présentée par l'UICN (Figure 18a).

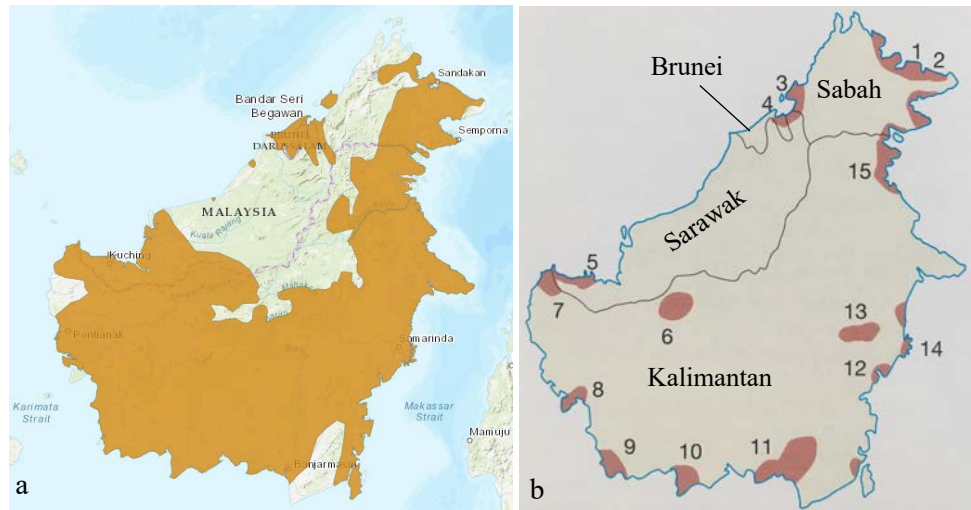


Figure 18. a) Répartition géographique théorique de *Nasalis larvatus* (IUCN, 2019) ; b) Distribution des populations (n=15) de *Nasalis larvatus* sur l'île de Bornéo (Phillipps & Phillipps, 2016).

Comme vu précédemment, seule la moitié de la surface totale de Bornéo est encore boisée (Gaveau *et al.*, 2016) (Tableau 1), essentiellement la zone centrale d'altitude (Figure 19a et b), inoccupée par les populations de nasiques (Figure 18b). Le nombre total de nasiques est estimé à 20 700 individus et se compose d'une quinzaine de populations, bien souvent isolées les unes des autres (Figure 18b) (Phillipps & Phillipps, 2016). Cette estimation est à considérer avec précaution puisque les dernières études de recensement des populations datent d'il y a 10 voire 30 ans [Sabah (Sha *et al.*, 2008), Kalimantan (Meijaard & Nijman, 2000a) et Sarawak (Bennett & Sebastian, 1988)], à l'exception du recensement récent de la population de la région Kinabatangan (numéro 1 sur la Figure 18b) (Matsuda *et al.*, 2018).

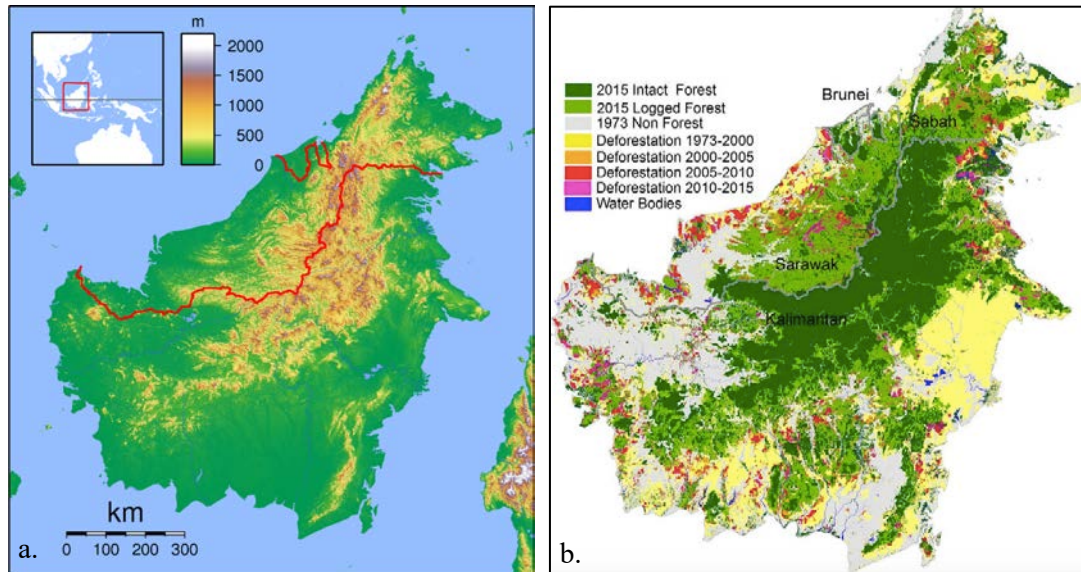


Figure 19. Cartes de Bornéo représentant a) la topographie de l'île (© wikipédia), b) les zones déboisées depuis 1973 et les zones encore boisées en 2015 (Gaveau *et al.*, 2016)

2.1.3 Statut de conservation de l'espèce et principales menaces

De 1986 à 1996 l'espèce *N. larvatus* était classée comme « Vulnérable » sur les listes rouges de l'UICN. Depuis 2000, le statut de conservation du nasique a été réévalué. Le net déclin des populations de nasiques au sein de l'aire de distribution de l'espèce a amené l'UICN à considérer l'espèce « En danger » d'extinction. En effet, l'effectif des populations de nasiques a subi une diminution de plus de 50% au cours des 40 dernières années (Meijaard *et al.*, 2008). Les principales menaces qui pèsent actuellement sur *N. larvatus* sont la destruction de ses habitats, ainsi que les pressions de braconnage (Meijaard & Nijman, 2000a; Sha *et al.*, 2011). Situés dans des zones de basse altitude, les habitats de *N. larvatus* sont généralement les premiers à être convoités pour nombre d'activités humaines (ex : habitations, fermes, cultures). Leur destruction est principalement engendrée par les déboisements, les feux de forêts, les mines, les assèchements de marais et l'établissement d'élevages de crevettes (Meijaard & Nijman, 2000a). Par exemple, dans le delta du fleuve Mahakam (Kalimantan oriental), une population de nasiques, estimée à plusieurs milliers d'individus au début des années 90, a disparu suite à la conversion de son habitat (les forêts marécageuses côtières) en élevages de crevettes (Meijaard *et al.*, 2008). Le braconnage est aussi une menace importante pour le nasique. L'espèce est chassée illégalement pour sa viande et les bézoards – petites pierres sécrétées dans son système digestif et prisées en médecine chinoise – tant à l'intérieur des terres qu'en régions côtières, notamment suite au développement et à l'accessibilité des bateaux à moteur et des armes à feu (Meijaard & Nijman, 2000a).

Le nasique a été placé en Annexe I de la convention CITES (CITES, 2015), interdisant son commerce (CITES, 1973). *N. larvatus* est également repris parmi les neuf espèces animales totalement protégées par le « Wildlife Conservation Enactment » de l'Etat de Sabah de 1997. Il en va de même à Sarawak où le nasique est listé comme espèce totalement protégée dans le « Wild Life Protection

Ordinance » de 1998. A Brunei et en Indonésie, le nasique est aussi considéré comme espèce protégée, respectivement par le « Wild Life Protection Act » de 1978 et le « Government Regulation of the Republic of Indonesia on Preserving Flora and Fauna Species NO.7/1999 ».

Bien que *N. larvatus* est légalement protégé au sein de son aire de distribution, la mise en application de la loi est souvent faible (Meijaard & Nijman, 2000a). Un exemple dramatique est l'inefficacité des autorités de conservation indonésiennes face à la destruction des forêts et au déploiement de zones agricoles sur la petite île de Kaget (Kalimantan du Sud). Un tiers de l'île était pourtant classé « Réserve Naturelle » (85 ha) et donc totalement protégé contre toute activité humaine. L'absence et l'inadéquation de réaction (la translocation des individus dans des zones non-protégées ou leur transfert en zoo) des autorités a engendré l'extinction de la population de nasiques (300 individus) résidant dans la réserve naturelle de l'île de Kaget (Meijaard & Nijman, 2000b).

Les nasiques sont actuellement présents dans 16 aires protégées au sein de l'île de Bornéo (Meijaard *et al.*, 2008), mais ces dernières sont bien souvent de taille insuffisante pour protéger efficacement les populations de nasiques qui y vivent (Mittermeier & Rylands, 2013). A Sabah, seuls 15% des populations de nasiques vivent au sein de zones totalement protégées, où toute activité de déforestation est strictement interdite (Sha *et al.*, 2008). De plus, comme expliqué précédemment, les aires protégées ne sont pas à l'abri des pressions anthropiques (Curran *et al.*, 2004). Récemment, le *Sabah Wildlife Department (SWD)* a élaboré un plan d'action sur 10 ans (2019-2028) pour la conservation du nasique à Sabah (Sabah Wildlife Department, 2019b), mais il n'en existe pas pour les autres entités administratives de l'île.

2.1.4 Organisation sociale

Les nasiques forment généralement des groupes sociaux stables, dits « *one-male groups* », composés d'un mâle adulte, de plusieurs femelles et de leur descendance. Il existe également des groupes de type « *all-male groups* » constitués uniquement de mâles (Bennett & Sebastian, 1988; Yeager, 1991). Les *all-male groups* sont généralement de plus petite taille que les *one-male groups*. Ces derniers se composent en moyenne d'une douzaine d'individus ; la taille du groupe étant fonction du type d'habitat et des densités de nasiques au sein des différents types d'habitats (Sha *et al.*, 2011). Un niveau supérieur d'organisation sociale peut également être observé chez *N. larvatus* lorsque plusieurs groupes se rapprochent, s'associent, notamment aux sites dorts en bordure de rivière (Yeager, 1991). Toutefois, les divers groupes de nasiques ne semblent pas former de denses associations, ou « *bands* », comme le font certaines espèces de primates qui pratiquent la « fission-fusion » (ex : les geladas, *Theropithecus gelada*, ou les babouins hamadryas, *Papio hamadryas*) et présentent, elles, de réelles sociétés complexes multi-niveaux. De fait, ce niveau supérieur d'organisation sociale n'a pas encore été confirmé chez *N. larvatus* (Matsuda *et al.*, 2010).

2.1.5 Utilisation de l'habitat

N. larvatus est une espèce diurne (Matsuda *et al.*, 2009a), essentiellement arboricole, présentant néanmoins des pieds partiellement palmés lui permettant de marcher sur les sols humides (ex : mangroves) et même de nager (Sha *et al.*, 2011). Le nasique est une espèce non-territoriale. En effet, les domaines vitaux de divers groupes de nasiques se chevauchent (Bennett & Sebastian, 1988; Yeager, 1989; Boonratana, 2000). De plus, les nasiques tolèrent la présence d'autres espèces de primates sympatriques avec lesquelles ils partagent leur habitat (Sha *et al.*, 2011). La taille des domaines vitaux varie selon les études, entre 81 et 900 hectares⁸, toutefois les méthodes d'estimation utilisées divergent selon les études. Les nasiques parcourent en moyenne 800-940 m par jour (distance_{min-max} = 167-3 037 m) (Boonratana, 2000; Matsuda *et al.*, 2009a; Stark, 2018), avec une distance perpendiculaire d'éloignement à la rivière généralement inférieure à 750-800 m (Salter *et al.*, 1985; Matsuda *et al.*, 2009a; Stark, 2018). Dans le LKWS, les nasiques utilisent leur habitat différemment selon leur localisation : ils utilisent préférentiellement les zones forestières proches des cours d'eau (< 110-200 m) et, à l'inverse, évitent et se déplacent plus rapidement dans les zones en bordure de plantations (Stark, 2018).

Dans les forêts riveraines, les nasiques retournent habituellement passer la nuit en bordure de cours d'eau (Salter *et al.*, 1985; Boonratana, 2000), où ils sélectionnent de grands arbres dorts (Bernard *et al.*, 2011; Feilen & Marshall, 2014; Thiry *et al.*, 2016). Toutefois, ils sélectionnent parfois des sites dorts à l'intérieur des terres (corrélation avec des températures élevées, des précipitations faibles, et les phases de lune ascendante) (Stark, 2018). Le choix d'arbres en bordure de fleuve est généralement considéré comme une stratégie d'anti-prédation. D'une part, la proximité d'un cours d'eau permettrait aux individus de réduire leur champ de surveillance face aux potentielles attaques de prédateurs terrestres, comme la panthère nébuleuse (*Neofelis diardi*) (Matsuda *et al.*, 2008b). D'autre part, sélectionner de grands arbres permettrait aussi aux individus de dormir éloignés de ces prédateurs (Cheyne *et al.*, 2012). De plus, la sélection d'arbres dorts dans des zones où la rivière est étroite et/ou la distance « branche-rive opposée » est courte, faciliterait aussi la fuite à la nage en cas d'attaque de prédateurs terrestres (Matsuda *et al.*, 2008a). Les arbres dorts sélectionnés par les nasiques présentent également certaines caractéristiques physiques qui soutiennent d'autres hypothèses que l'anti-prédation. Par exemple, des arbres aux branches épaisses permettraient aux individus d'un même groupe de dormir à proximité, facilitant les interactions sociales et offriraient un certain confort, diminuant les risques de chute (Bernard *et al.*, 2011). La sélection d'arbres émergents réduirait aussi les risques de piqûres de moustiques (Feilen & Marshall, 2014).

⁸ Estimations de la taille des domaines vitaux : 81 ha (Stark *et al.*, 2017b), 100-150 ha (Kawabe & Mano, 1972), 130 ha (Yeager, 1989), 138 ha (Matsuda *et al.*, 2009a), 220 ha (Boonratana, 2000) et 900 ha (Bennett & Sebastian, 1988)

2.1.6 Régime alimentaire

Les colobinés présentent un système digestif particulier qui les différencie largement des autres groupes de primates (Bauchop & Martucci, 1968; Kay *et al.*, 1976; Chivers, 1994). Ils possèdent un grand estomac compartimenté dit « *foregut fermenting* » (similaire aux ruminants), constitué de trois ou quatre poches : (*presaccus*), *saccus*, estomac tubiforme et estomac glandulaire (Figure 20) (Matsuda *et al.*, 2019a). Les deux premières sections constituent une chambre de fermentation (Chivers, 1994; Nijboer & Clauss, 2006) abritant un vaste panel de bactéries qui permettent de digérer les composés cellulotiques des plantes (Bauchop & Martucci, 1968; Kay *et al.*, 1976; Chivers, 1994). Cette adaptation physiologique permet aux colobinés de se nourrir de grandes quantités de feuilles (Bauchop & Martucci, 1968). Une étude récente suggère d'ailleurs que le présaccus (estomac quadripartite) est une adaptation apparue chez les espèces de colobinés qui dépendent fortement des feuilles comme *fallback food* (c'est-à-dire, comme source de nourriture de secours) (Matsuda *et al.*, 2019a), tel que le nasique dont l'estomac est quadripartite (Caton, 1998 dans Nijboer & Clauss 2006). Les feuilles constituent une source de nourriture omniprésente en forêt, mais que d'autres groupes de primates ne peuvent pas tant exploiter. De fait, cette capacité de digérer la cellulose permet certainement d'expliquer la biomasse élevée de cette sous-famille de primates au sein des forêts tropicales (Yeager, 1989). Les colobinés évitent par contre de consommer des fruits mûrs, riches en sucre, qui peuvent avoir des effets délétères (Waterman & Kool, 1994) : fermentation bactérienne des sucres, avec production de gaz et d'acides dans l'estomac (Sha *et al.*, 2011).

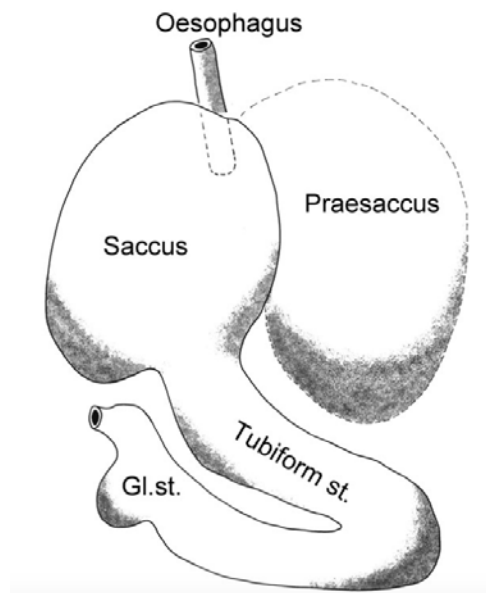


Figure 20. Illustration d'un estomac de colobiné. Où « Tubiform st. » correspond à estomac tubiforme, et « Gl. st. » à estomac glandulaire (Matsuda *et al.*, 2019a)

Les nasiques ont longtemps été considérés comme des primates essentiellement folivores présentant une diversité alimentaire peu variée (Kern, 1964; Kawabe & Mano, 1972). Toutefois, des recherches plus récentes ont démontré qu'ils se nourrissent aussi volontiers de fruits immatures (Bennett & Sebastian, 1988; Yeager, 1989; Boonratana, 2003; Matsuda *et al.*, 2009b). De fait, les nasiques sont, de nos jours, qualifiés de primates folivores / frugivores, présentant également un attrait certain pour la consommation de graines (Yeager, 1989; Matsuda, 2008). Ils semblent d'ailleurs préférer les fruits immatures aux jeunes feuilles lorsque les deux sources de nourritures sont disponibles (Matsuda *et al.*, 2009b). Feuilles et fruits constituent ensemble plus de 90% du régime alimentaire des nasiques, représentant respectivement 66% vs. 26% (Matsuda *et al.*, 2009b), 52% vs. 40% (Yeager, 1989), et 41% vs. 50% (Bennett & Sebastian, 1988) des aliments consommés par les nasiques dans différents types d'habitats, respectivement forêts riveraines, marécageuses et mangroves. Comme les autres espèces de colobinés, les nasiques se déplacent davantage lors de périodes de fructification et à l'inverse réduisent les distances qu'ils parcourent lorsque les jeunes feuilles sont abondantes (Stark, 2018).

Contrairement à ce que rapportent les anciennes publications (Kern, 1964), il s'avère que *N. larvatus* présente une diversité alimentaire plus élevée. Ce colobiné consomme une grande variété d'espèces de plantes, notamment lors des saisons de folivorie lorsque les ressources alimentaires préférées, les fruits immatures, se font plus rares (Yeager, 1989; Matsuda *et al.*, 2009b). Tout comme les autres espèces de colobinés, les nasiques sélectionnent préférentiellement des jeunes feuilles riches en protéines et pauvres en fibres (Yeager *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 2017). Parmi les plantes préférentiellement consommées, ils sélectionnent généralement les espèces les plus abondantes (Matsuda *et al.*, 2013b).

2.1.7 Prédation ou dispersion des graines ?

En raison de leur régime alimentaire principalement folivore ainsi que de leur attrait pour les fruits immatures, les colobinés ne sont habituellement pas considérés comme des disperseurs de graines ; ils sont au contraire généralement qualifiés de prédateurs de graines, détruisant la plupart de celles qu'ils consomment (Corlett, 1998, 2017). En considérant la vaste distribution et l'importante biomasse des colobinés au sein des forêts tropicales d'Asie et d'Afrique, plusieurs auteurs se sont toutefois interrogés sur le rôle que pourraient jouer les colobinés dans la dispersion de graines – un rôle potentiellement sous-estimé jusqu'ici (Matsuda *et al.*, 2013a; Corlett, 2017; Tsuji *et al.*, 2017). Or, ces études n'ont pour la plupart pas testé le succès de germination des graines déféquées par ces primates (Matsuda *et al.*, 2013a; Nguyen *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018) ou ont recensé de très faibles taux de germination (Tsuji *et al.*, 2017). Nous nous intéresserons au rôle que joue le nasique dans la dispersion et la germination des graines dans le chapitre 6 de cette thèse.

2.2 Site d'étude : Les plaines inondables du fleuve Kinabatangan

2.2.1 Localisation, climat et végétation

Notre site d'étude se situe au sein des plaines inondables du fleuve Kinabatangan, à Sabah, dans le nord-est de l'île de Bornéo (Malaisie) (5°18' N – 5°42' N and 117°54' E – 118°33' E) (Figure 22). Le climat y est tropical humide, avec des températures annuelles moyennes de 23 à 36°C et des précipitations annuelles moyennes de 3 000 mm (Stark, 2018). Le fleuve Kinabatangan est le plus long fleuve de l'État de Sabah (560 km) ; il est d'une importance vitale pour les populations locales, assurant transport et subsistance (Hai *et al.*, 2001). De nombreux lacs, issus des méandres du fleuve, dits « *oxbow lakes* » en anglais, sont également présents dans la région. L'habitat y est composé d'une matrice de forêts riveraines, forêts sèches de diptérocarpes, mangroves, forêts inondables de façon saisonnière, forêts marécageuses et d'estuaires de palmiers *nypa* (*Nypa fruticans*) (Estes *et al.*, 2012).

2.2.2 Faune de la région Kinabatangan

Comme en témoignent les photos ci-dessous (Figure 21), les forêts longeant le fleuve Kinabatangan abritent une belle diversité animale. Outre l'éléphant de Bornéo (*Elephas maximus borneensis*), la panthère nébuleuse (*Neofelis diardi*), l'ours malais (*Helarctos malayanus*) ou le cochon barbu (*Sus barbatus*), de nombreuses espèces de vertébrés sont également observées dans le sanctuaire: des civettes (Viverridae spp.), loutres (Lutrinae spp.), chauves-souris, calaos, crocodiles marins (*Crocodylus porosus*) ou encore des varans malais (*Varanus salvator*).



Figure 21. Diversité de la faune de la région Kinabatangan a) une panthère nébuleuse ; b) un éléphant de Bornéo ; c) un calao largup (*Anorrhinus galeritus*); d) des loutres (*Lutogale perspicillata*); e) un ours malais ; f) des cochons barbus (photos prises par des *camera traps* ©DGFC)

Dix espèces de primates vivent au sein des forêts de la plaine inondable du fleuve Kinabatangan. Huit espèces sont diurnes [l'orang-outan de Bornéo (*Pongo pygmaeus*), le nasique (*Nasalis larvatus*), le gibbon de Bornéo (*Hylobates muelleri*), le semnopithèque de Hose (*Presbytis hosei*), le semnopithèque rubicond (*P. rubicunda*), le semnopithèque à coiffe (*Trachypithecus cristatus*), le macaque à longue queue (*Macaca fascicularis*) et le macaque à queue de cochon (*M. nemestrina*)] et deux sont nocturnes [le nycticebe des Philippines (*Nycticebus menagensis*) et le tarsier de Horsefield (*Tarsius bancanus*)].

La région Kinabatangan abrite la plus grande population de nasiques de Sabah (1 960 individus, répartis en 150 groupes sociaux) (Matsuda *et al.*, 2018) ; elle est considérée stable (Stark *et al.*, 2012; Matsuda *et al.*, 2018). Toutefois, la taille moyenne des groupes semble avoir diminué depuis 2004, indiquant que les modifications et fragmentations de l'habitat pourraient affecter la structure sociale des groupes de nasiques (Matsuda *et al.*, 2018).

2.2.3 Le Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary

Le Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary (LKWS) se situe au sein des plaines inondables du fleuve Kinabatangan. Cette aire protégée a été reconnue par le gouvernement de Sabah en 2005. Le LKWS se compose de 27 000 hectares de forêts, subdivisés en 10 blocs (ou lots). Il est connecté à certains patches forestiers classés « *Virgin Jungle Forest Reserves (VJFR)* » (15 000 ha, aussi protégés) ainsi qu'à des terres, privées ou appartenant à l'État, plus ou moins dégradées (10 000 ha, non-protégées) (Ancrenaz *et al.*, 2004). En plus du statut de protection des fragments du LKWS et VJFR, la loi de 1998

(Sabah's Water Enactment) impose qu'une bande de 20 mètres de forêt soit désignée comme réserve riveraine (et soit donc protégée) le long de tous les cours d'eau de plus de 3 mètres de large, c'est-à-dire tout le long du fleuve Kinabatangan et de ses affluents (State of Sabah, 1998). Dès lors, l'ensemble des parcelles du *LKWS* constitue un corridor semi-continu de végétation naturelle reliant les mangroves côtières aux forêts sèches situées en amont du fleuve (Estes *et al.*, 2012). Toutefois, la connectivité des parcelles forestières n'y est pas optimale, puisque certains blocs sont reliés entre eux par des zones de forêts non-protégées ou dégradées, et que d'autres sont totalement isolés. Le *LKWS* est entouré de nombreuses plantations de palmiers à huile (en blanc sur la Figure 22), qui constituent de réelles barrières pour les déplacements des nombreuses espèces animales qui y vivent.

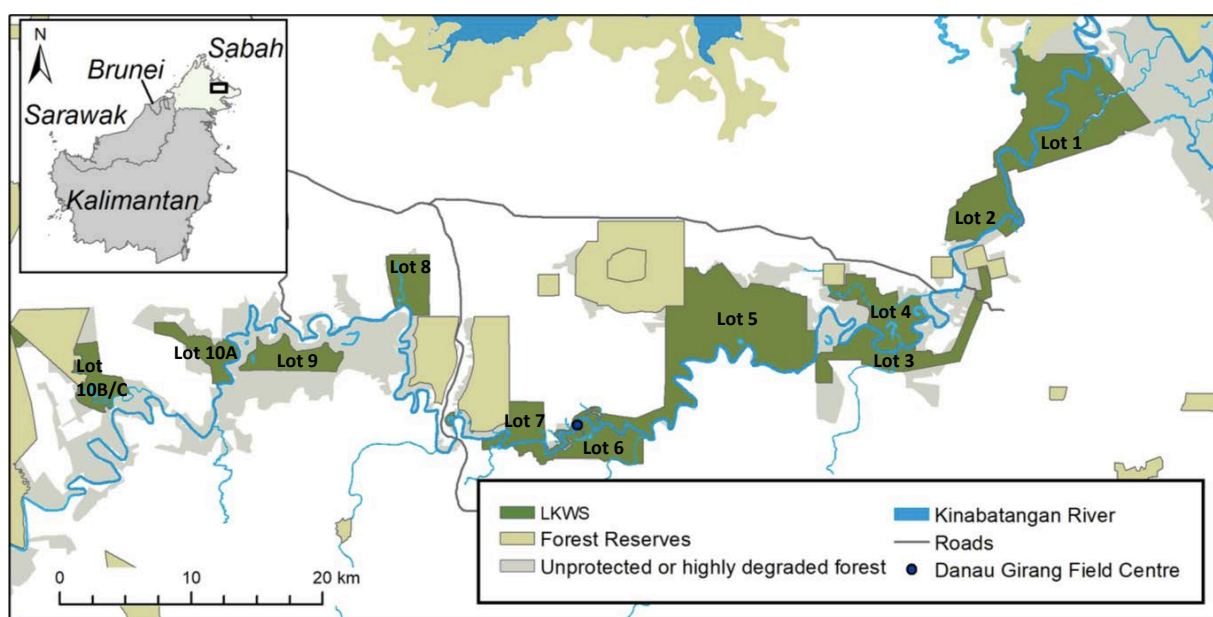


Figure 22. Carte illustrant les forêts protégées et non-protégées au sein de la plaine inondable du fleuve Kinabatangan, et la localisation du centre de recherche *Danau Girang Field Centre* (Stark, 2018)

2.2.4 Pressions anthropiques dans la région Kinabatangan

Depuis le milieu des années 50, les plaines inondables du fleuve Kinabatangan sont soumises à des pressions anthropiques intenses, telles que l'exploitation des forêts pour l'extraction de bois d'œuvre et la conversion des habitats naturels en zones agricoles industrielles (Lackman-Ancrenaz *et al.*, 2001). Pôle d'agriculture intensive, la région Kinabatangan comprend, à elle seule, plus d'un quart des surfaces totales allouées aux plantations de palmiers à huile de l'État de Sabah (Hai *et al.*, 2001). Entre 2005 et 2014, plus de 9 000 ha de forêt furent encore rasés au profit de plantations (Matsuda *et al.*, 2018). Alors que 85% des forêts non-protégées de la région Kinabatangan ne sont pas appropriées à la culture de palmier à huile (en raison des risques d'inondations saisonnières), plus d'un tiers d'entre elles ont néanmoins été allouées à ce type d'agriculture (Matsuda *et al.*, 2018). De fait, près de la moitié de la

région Kinabatangan (> 250 000 ha) est allouée à la culture de palmiers à huile (Abram *et al.*, 2014) (Figure 23).



Figure 23. Photo aérienne du fleuve Kinabatangan bordé de plantations de palmiers à huile (© Hutan)

Dans cet océan de palmiers à huile subsistent néanmoins quelques fragments forestiers, dont la plupart ont été exploités à maintes reprises au cours du siècle dernier (Ancrenaz *et al.*, 2004). Une étude récente (Stark *et al.*, 2017a) a notamment mis en évidence le déboisement de 47 ha de forêt (d'appartenance privée) le long du fleuve Kinabatangan, afin de les convertir en cultures de caoutchouc. Et l'analyse d'images obtenues par drone révèle que près d'un ha de forêt a été coupé à moins de 20 mètres du fleuve Kinabatangan et de ses affluents, soit dans une zone protégée (cf. Sabah Water Ressources Enactment de 1998). De plus, ces zones déboisées représentaient 30% (14 ha) du domaine vital d'un groupe de nasiques (domaine vital = 49 ha) et 11% de ses sites dorts (données collectées via collier GPS) (Figure 24) (Stark *et al.*, 2017a).



Figure 24. Illustration du déboisement de 2015 le long du fleuve Kinabatangan et des points GPS correspondants à un groupe de nasiques dans cette zone (Stark *et al.*, 2017a)

2.3 Méthodologies générales

2.3.1 Station de recherche : *Danau Girang Field Centre*

Nous avons effectué l'ensemble de notre travail de recherche de terrain depuis le Centre de recherche *Danau Girang Field Centre* (DGFC, Figure 25), situé dans le Lot 6 du LKWS (Figure 22). Ce Centre a vu le jour en 2008 ; il est dirigé par le Dr. Benoît Goossens, avec le soutien du *Sabah Wildlife Department* (SWD) et de l'Université de Cardiff. Les recherches menées depuis ce centre visent à assurer la conservation à long terme de la biodiversité du LKWS. A l'aide de diverses technologies (ex : colliers GPS, drones) les chercheurs tentent de comprendre comment les espèces animales vivent dans un paysage tellement fragmenté (Goossens, 2019). Le Centre DGFC a notamment initié plusieurs plans d'action pour la conservation d'espèces emblématiques à Sabah, telles que le nasique et le banteng (Sabah Wildlife Department, 2018, 2019).



Figure 25. Environnement du centre de recherche *Danau Girang Field Centre* ; a) et f) Fleuve Kinabatangan ; b) Logements ; c) et e) Embarcadere et bateaux à moteurs utilisés pour aller sur le terrain ; et d) Centre de recherche

2.3.2 Planning des missions de terrain

Lors de notre doctorat, nous avons effectué 3 missions de terrain dans le LKWS. Au total, nous avons collecté nos données sur le terrain pendant 15 mois, en saison sèche et saison des pluies (Figure 26).

Saison sèche			Saison des pluies								
2014			2015								
Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Févr.	Mars	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.
							1 ^{ère} mission de terrain				
2015			2016								
Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Févr.	Mars	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.
			2 ^{ième} mission de terrain								
2016			2017								
Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Févr.	Mars	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.
	3 ^{ième} mission de terrain										

Figure 26. Planning des missions de terrain dans le *LKWS*

Pour collecter nos données sur le terrain, nous étions toujours accompagnées d'au moins un assistant de recherche du Centre DGFC. Ils conduisaient le bateau à moteur, nous assistaient en forêt (ex : orientation, utilisation de la machette), nous aidaient à repérer les groupes de nasiques aux sites dorts, à échantillonner fèces et plantes, ainsi qu'à délimiter les plots botaniques. Ces différentes activités sont détaillées dans les rubriques ci-dessous.

2.3.3 Observations comportementales directes

Comme vu précédemment, dans les forêts riveraines les nasiques sélectionnent généralement leurs arbres dorts le long du cours d'eau (Matsuda *et al.*, 2011b). Pour étudier les groupes de nasiques en forêt riveraine, il est donc fréquent de réaliser des sorties en bateau en fin de journée, ainsi qu'au lever du soleil, pour observer les individus lorsqu'ils sont à leurs sites dorts.

Lors de notre thèse, nous avons organisé des sorties régulières en bateau à moteur en fin d'après-midi (~16h30) à la recherche de groupes de nasiques installés dans leurs arbres dorts, le long d'une section de 21 km sur le fleuve Kinabatangan (de part et d'autre du Centre *DGFC*). Puisque les groupes de nasiques au sein du *LKWS* n'étaient pas habitués et que nous n'avons dès lors pas pu les reconnaître, nous avons parcouru différentes parties de la section du fleuve au cours du même mois, afin d'éviter d'échantillonner le même groupe d'individus. Au premier groupe de nasiques rencontré, nous arrêtons le bateau sur la rive opposée et collections des données comportementales à l'aide de nos jumelles (© Meopta 8x32) de 17h00 à 18h00-18h15 (coucher du soleil). Lors de la première mission de terrain (Mai-Août 2015), nous avons utilisé la méthode *Ad libitum* (Altmann, 1974) pour collecter les données alimentaires. Ensuite, lors des missions suivantes, nous avons utilisé la méthode de *Scan Sampling* (Altmann, 1974), avec des intervalles de 10 minutes. Nous avons observé le comportement de chaque individu du groupe [ex : repos, mouvement, nutrition, autres (Matsuda *et al.*, 2009b)]. Entre les scans, nous avons utilisé la méthode *Ad libitum* pour collecter le plus grand nombre d'événements

alimentaires, même ceux potentiellement plus brefs ou rares, qui surviendraient entre deux scans. Lorsqu'un individu était observé en train de se nourrir, nous portions une attention particulière à sa localisation (ex : dans quel arbre, présence de liane, au sol) afin de pouvoir identifier l'espèce consommée. Nous notions également, si possible, quels types d'aliment étaient consommés (ex : feuille, fruit, fleur). Le matin, nous quittions le Centre *DGFC* vers 5h30 et retournions au site du soir précédent [coordonnées enregistrées à l'aide de notre GPS (© Garmin 64s)]. A partir de 6h00 (lever du soleil), nous continuions à observer les individus du même groupe. Lorsque le groupe quittait le site dortoir (~ 7h00), nous traversions le fleuve et accostions sur la rive dortoir. Nous localisions les arbres, lianes et plantes herbacées que les individus avaient consommés et les identifions. Quand nous n'étions pas capables de les identifier jusqu'à l'espèce, nous avons collecté des échantillons (ex : rameaux de feuilles) que nous avons envoyés au *Forest Research Centre (FRC)*, à Sandakan, Sabah) pour les faire identifier par des experts botanistes (Dr. Joan T. Pereira et ses collègues). Un échantillon de feuille de chaque espèce consommée a été collecté pour construire la base de données locale nécessaire à la partie *DNA metabarcoding* de notre projet de recherche (voir ci-dessous).

2.3.4 Collecte des fèces sous les arbres dortoirs

Chaque matin, sous les arbres dortoirs des individus observés, nous avons collecté plusieurs échantillons fécaux frais (n=3-4). Au cours des trois missions de terrain, nous avons collecté un total de 721 fèces de nasiques, correspondant à 245 identifiants GPS⁹ le long du fleuve Kinabatangan (Figure 27). En moyenne, nous avons échantillonné 16 ± 7 groupes de nasiques chaque mois. Les fèces étaient ensuite analysées ou stockées différemment, selon les parties du projet de recherche pour lesquelles elles étaient collectées. Lorsque des primates sympatriques [macaques à longue queue et à queue de cochon (*Macaca fascicularis* et *M. nemestrina*), semnopithèques de Hose, rubicond, et à coiffe (*Presbytis hosei*, *P. rubicunda*, et *Trachypithecus cristatus*), orang-outans de Bornéo (*Pongo pygmaeus*) et gibbons de Bornéo (*Hylobates muelleri*)] étaient observés à proximité (≤ 10 m) du groupe de nasiques, nous n'avons pas collecté d'échantillons fécaux.

⁹ Un identifiant GPS correspond à un groupe de nasiques pour lequel nous collections un ou plusieurs échantillons fécaux. Puisque nous ne distinguons pas les groupes de nasiques les uns des autres, les mêmes groupes sont probablement échantillonnés plusieurs fois au cours de l'étude. Lorsque nous échantillonnions plusieurs groupes le même jour (ex : l'un sur la rive sud du fleuve, l'autre sur la rive nord), nous utilisions des identifiants différents.

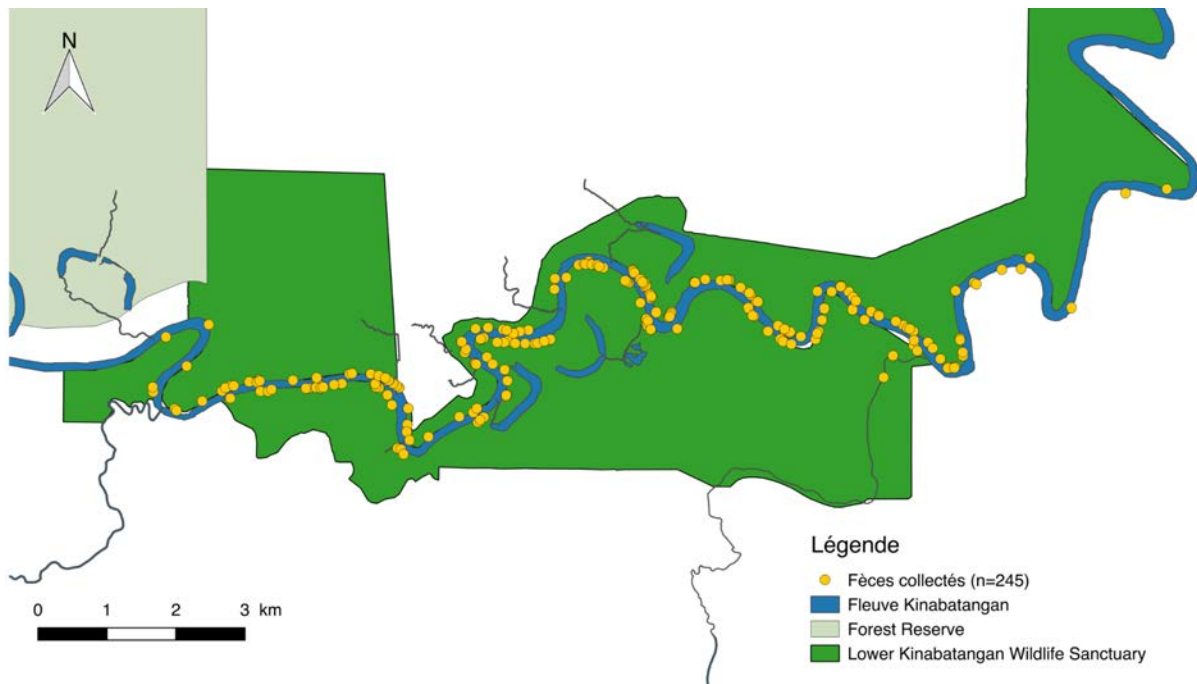


Figure 27. Carte du site d'étude représentant les 245 localisations d'échantillonnage de fèces de nasiques

2.3.4.1 Analyses manuelles et tests de germination

Un échantillon fécal était collecté dans un tube Falcon. De retour au centre de recherche, il était pesé, et ensuite placé dans un tamis (maille de 0,4 mm) sous l'eau courante pour évacuer la matière fécale. Les résidus du tamis étaient ensuite placés dans une boîte de Pétri et observés au binoculaire. Nous avons ensuite compté et identifié les graines retrouvées intactes dans les fèces de nasiques. Ces graines étaient ensuite utilisées dans les tests de germination (voir point 2.3.5).

Un second échantillon fécal était collecté (dans un second tube Falcon) pour mettre en place le traitement F2 des tests de germination (voir détails au point 2.3.5 ci-dessous).

2.3.4.2 Taille des particules fécales

Un autre échantillon fécal était collecté dans un tube Falcon. De retour au centre de recherche, de l'éthanol 70% était versé dans le tube (Matsuda *et al.*, 2014b), afin de conserver l'échantillon jusqu'aux analyses de taille des particules fécales, réalisées à l'Université de Zurich (voir point 2.3.6).

2.3.4.3 Régime alimentaire par DNA metabarcoding

Un dernier échantillon fécal était collecté dans un tube pour l'étude du régime alimentaire du nasique par *DNA metabarcoding*. De retour au Centre de recherche, nous avons utilisé une méthode de stockage en deux étapes (Nsubuga *et al.*, 2004). Nous avons versé de l'éthanol 95% dans le tube. Après 24 heures, nous avons vidé l'alcool et ajouté des billes de silices (à indicateur coloré). Chaque jour, nous avons remplacé les billes par de nouvelles, jusqu'à ce que l'échantillon fécal soit totalement sec. Ces échantillons fécaux ont été stockés jusqu'aux analyses réalisées à Bruxelles (voir point 2.3.7).

2.3.5 Tests de germination

Dans les différentes expériences de germination décrites ci-dessous, nous définissons un événement de germination comme l'émergence de la radicule (Trolliet *et al.*, 2016). Les graines des divers traitements étaient surveillées et arrosées tous les quatre jours pour éviter la dessiccation.

Pour chaque espèce de graine retrouvée dans les fèces de nasiques (voir point 2.3.4.1), nous avons d'abord effectué des tests de germination préliminaires. Les graines étaient disposées sur du papier filtre posé dans des boîtes de Pétri (maximum 16 graines / boîte). Les boîtes étaient placées dans une étagère située à l'arrière du bâtiment du centre de recherche, à l'extérieur et à l'ombre, pendant 60 jours. L'étagère était recouverte d'un fin grillage et ses pieds étaient disposés dans des seaux d'eau savonneuse afin d'éviter les risques de prédation / dispersion de graines par les insectes.

Pour les graines de *Nauclea* spp. retrouvées abondamment dans les fèces (voir chapitre 6), nous avons mis en place des tests de germination plus avancés. Les graines étaient placées dans des boîtes de Pétri remplies de terre (0,5-1cm d'épaisseur, collectée dans la forêt). Les boîtes étaient placées dans l'étagère précédemment décrite, pendant 60 jours (à l'ombre). Elles étaient ensuite placées dans des conditions d'exposition directe au soleil pendant les 20 derniers jours de l'expérience ($t_{\text{final}} = 80$ jours) (Hodgkison *et al.*, 2003). Pour comprendre comment les nasiques affectent la germination des graines de *Nauclea* spp., nous avons établi cinq types de traitements (Tableau 2), en nous basant sur l'article de Samuels & Levey (2005). Nous avons étudié : 1) l'influence du retrait de la pulpe [graines sans pulpe extraites de fruits immatures (FR1) et mûrs (FR2) vs. graines avec pulpe issues de fruits mûrs (FR3)] ; et 2) l'influence de la digestion par les nasiques [graines passées par le tractus digestif, sans (F1) ou avec (F2) matière fécale vs. graines sans pulpes extraites des fruits (FR1 et FR2)].

Tableau 2. Descriptions des cinq traitements utilisés dans les tests de germination de graines avancés

Codes	Traitements des graines
Graines <i>Nauclea</i> spp. ingérées par les nasiques	
F1	Graines issues de fèces (sans matière fécale)
F2	Graines issues de fèces (avec matière fécale) ¹⁰
Graines contrôles des fruits de <i>Nauclea orientalis</i>	
FR1	Graines issues de fruits immatures (sans pulpe)
FR2	Graines issues de fruits mûrs (sans pulpe)
FR3	Graines issues de fruits mûrs (avec pulpe)

¹⁰ Pour réaliser le traitement F2 (avec matière fécale), nous avons utilisé le second échantillon fécal collecté sous les arbres d'ortie des nasiques (voir point 2.3.4.1). Nous disposions 16 portions de l'échantillon dans la boîte de Pétri et ajoutons ensuite une graine *Nauclea* spp. sur chaque tas de matière fécale.

Pour les graines des traitements F1 et F2, nous avons limité l'identification au genre *Nauclea*. Deux espèces, *Nauclea orientalis* et *N. subdita*, sont présentes dans notre site d'étude et leurs graines, de petite taille (< 2 mm de long), n'étaient pas morphologiquement discernables l'une de l'autre. Toutefois, pour les traitements contrôles (FR1, FR2 et FR3), nous avons uniquement utilisé des fruits de *Nauclea orientalis*. En effet, bien que les fruits de *N. orientalis* et *N. subdita* soient consommés par les nasiques (Matsuda et al. 2009b; Chapitre 3), *N. orientalis* représente 88% des événements de frugivorie le long du fleuve Kinabatangan (observations comportementales, voir chapitre 3). Pour comparer le succès de germination des graines des différents traitements, nous avons utilisé des analyses de survie décrites dans McNair et al. (2012).

Les tests de germination avancés font partie du travail de mémoire d'Oriana Bhasin (Master 2, ULB) qui est venue sur le terrain de décembre 2016 à mars 2017, et dont nous avons conçu et supervisé la recherche.

2.3.6 Analyse de la taille des particules fécales

Pour étudier la taille des particules fécales chez le nasique, nous avons effectué deux séjours de recherche (novembre 2015 et janvier 2018) dans le laboratoire de la *Clinic for Zoo Animals, Exotic Pets and Wildlife* du Professeur Marcus Clauss, à l'Université de Zurich. Nous y avons utilisé une machine à tamis animée '*wet sieving machine*' permettant de scinder les échantillons fécaux (de nasiques dans ce cas-ci), selon la taille des particules fécales. Cette machine consiste en un empilement de 10 tamis de taille de maille décroissante [8 ; 4 ; 2 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,63 ; 0,04 ; 0,025 mm (Retsch AS 200 digit, Haan, Germany)] (Figure 28).

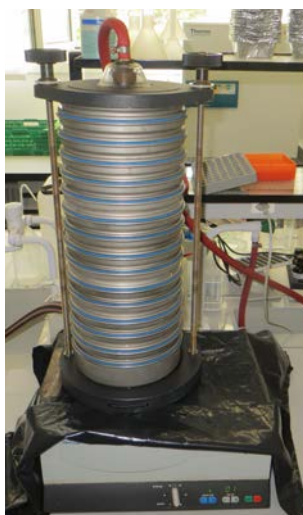


Figure 28. Machine à tamis animée utilisée pour étudier la taille des particules fécales de nasiques

Au préalable, des boîtes de Pétri vides, propres et sèches (une boîte/tamis, donc 10/échantillon) étaient numérotées et pesées avec une balance analytique [précision de ± 1 mg (Kern AEJ 220-4M, Kern, Balingen, Germany)]. De plus, chaque échantillon fécal était d'abord placé dans un récipient

contenant un litre d'eau pendant 12 heures afin de le laisser lentement se désagréger. Cet échantillon fécal (en suspension dans l'eau) était ensuite déversé au sommet de la cascade de tamis. Connectée à une arrivée d'eau (2 litres/minute), cette dernière vibrait avec une amplitude d'environ 2 mm de manière à répartir l'échantillon déversé au sommet dans les différents tamis empilés dessous, selon la taille des particules. Après 10 minutes de tamisage, nous récoltions le contenu de chaque tamis et le placions dans la boîte de Pétri correspondante. Lorsque des particules étaient retenues sur le premier tamis, la taille de la plus grande particule était notée et utilisée dans la formule mentionnée ci-dessous. De plus, quand les tamis contenaient des graines de grande taille, celles-ci étaient pesées à part et soustraites de la masse des particules du tamis correspondant. Chaque boîte était ensuite placée au four à 104°C pendant 24 heures afin que le contenu sèche, puis refroidie au dessiccateur avant d'être finalement pesée. Les masses calculées pour chaque boîte étaient ensuite utilisées dans la formule pour calculer l'indice *dMEAN* (voir formule ci-dessous) [les détails sont disponibles dans Fritz et al. (2012)]. Cet indice a été retenu comme l'indice standard décrivant la valeur moyenne de la taille des particules fécales par la méthode d'analyse avec tamis.

Formule pour calculer l'indice *dMean* de chaque échantillon fécal analysé

$$dMEAN = \sum_{i=1}^n p(i) \times \frac{S(i+1) + S(i)}{2}$$

2.3.7 DNA metabarcoding

2.3.7.1 Description de la méthode

Le *DNA metabarcoding* permet l'identification de plusieurs espèces présentes au sein d'un échantillon contenant de l'ADN dégradé (ex : sol, fèces) ; l'émergence de cette méthode a été facilitée par le développement des nouvelles techniques de séquençage [ex : *Next Generation Sequencing* (NGS), *High-Throughput Sequencing* (HTS)] (Taberlet et al., 2012). Efficace et non-invasif, le *DNA metabarcoding* a déjà été utilisé pour étudier le régime alimentaire de plusieurs espèces de primates (Bradley et al., 2007; Quéméré et al., 2013; Srivathsan et al., 2014, 2016; Boom, 2015), mais n'a encore jamais été utilisé pour le nasique. La Figure 29 schématise le fonctionnement de la méthode de *DNA metabarcoding* que nous avons mise en place pour déterminer le régime alimentaire de *N. larvatus* dans notre site d'étude.

En résumé, la méthode consiste ici à détecter les séquences d'ADN végétal contenues dans les fèces de nasique et à les comparer aux séquences disponibles dans les deux bases de données de référence (voir point 2.3.7.2) afin de les identifier. Dans cette étude, nous avons utilisé le fragment court d'ADN [10-143 paires de bases (bp)] de la boucle P6 du gène chloroplastique *trnL* (UAA) développé par (Taberlet et al., 2007) ; le barcode *trnL* est le plus communément utilisé dans les études sur le régime alimentaire herbivore (Moorhouse-Gann et al., 2018).

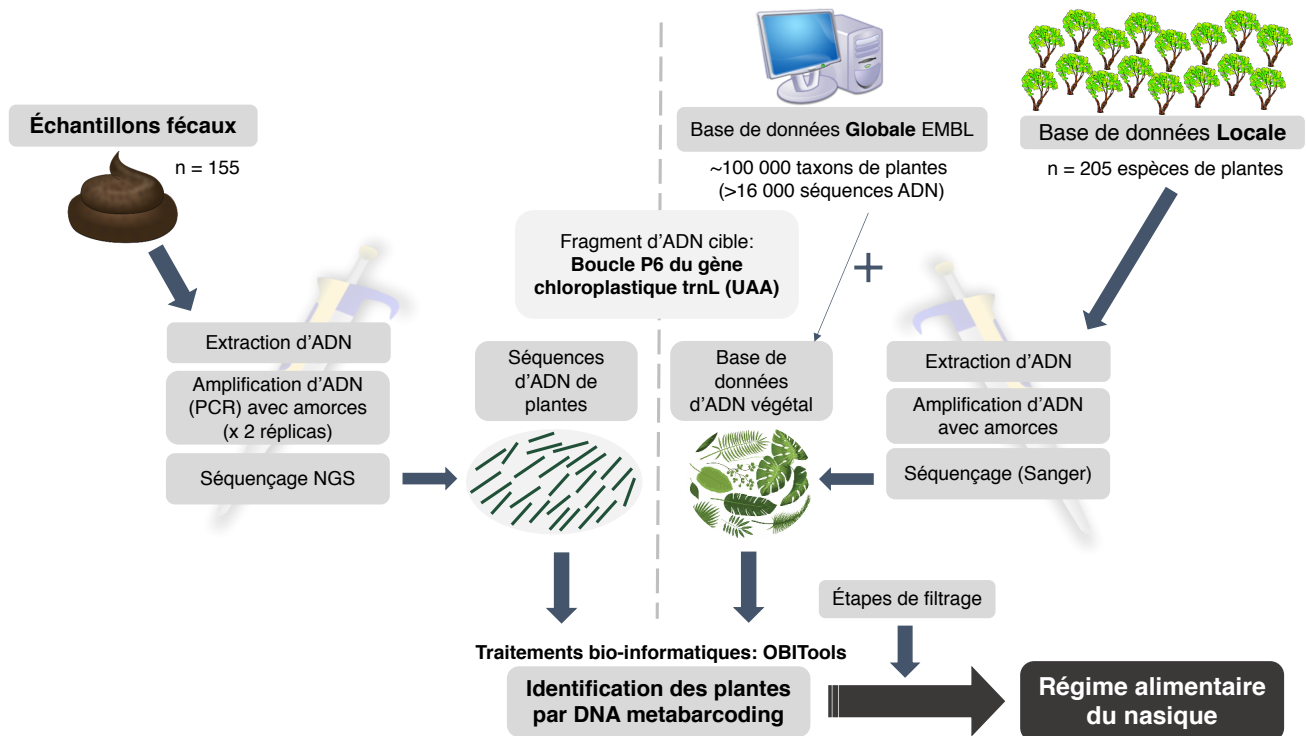


Figure 29. Illustration schématisant la méthode de *DNA metabarcoding* utilisée pour étudier le régime alimentaire du nasique

La majorité des étapes détaillées ci-dessous se sont déroulées dans le laboratoire d'Écologie Biologique et Évolutive (ULB), à l'exception des collectes d'échantillons (fèces et plantes) effectuées sur le terrain et du séquençage NGS réalisé au laboratoire GIGA de l'Université de Liège (ULg). Nous avons effectué la plupart de ces étapes de laboratoire en collaboration avec Esra Kaymak, technicienne de laboratoire, et Arthur Boom, doctorant.

2.3.7.2 Construction des bases de données de référence

Deux bases de données de références ont été utilisées pour confronter les séquences ADN détectées dans les fèces : 1) une base de données globale disponible en ligne sur EMBL (> 16 000 séquences) ; 2) une base de données locale contenant 205 espèces végétales collectées dans le site d'étude.

Pour construire la base de données globale, nous avons extrait 16 711 séquences trnL disponibles en ligne sur la plateforme EMBL (release 129), en utilisant le programme ecoPCR. Pour construire la base de données locale, nous avons échantillonné 475 plantes (n= 205 espèces) présentes dans notre site d'étude (ex : plots botaniques, sites dorts, etc.). Un rameau de chaque plante est conservé dans un herbier que nous avons déposé à l'herbarium de l'Université libre de Bruxelles (BRLU, Thiry-1–Thiry-478). De plus, une feuille de chaque échantillon végétal a été conservée dans un

sachet contenant des billes de silices. Nous avons utilisé un fragment de feuille séchée (20 mg) de chaque espèce pour construire la base de données locale. Les protocoles d'extraction, d'amplification et de séquençage sont détaillés dans la partie « Methods » du Chapitre 3 de cette thèse.

2.3.7.3 Collecte des échantillons fécaux et extraction d'ADN

Sur l'ensemble des échantillons collectés sur le terrain (voir point 2.3.4.3), 155 ont été utilisés pour étudier le régime alimentaire du nasique dans le *LKWS*. Nous avons utilisé 25 mg de chacun de ces échantillons fécaux pour en extraire de l'ADN, à l'aide du kit « DNeasy[®] Blood and Tissue (Qiagen) », en suivant les instructions du manuel.

2.3.7.4 Préparation des bibliothèques et séquençage

Cette étape consiste à amplifier l'amplicon trnL à l'aide de deux PCR consécutives, dont la deuxième permet de « tagger » les échantillons, c'est-à-dire d'attacher aux séquences amplifiées des indicateurs propres aux échantillons fécaux qui les contiennent. Pour préparer ces bibliothèques d'amplicons nous avons suivi le protocole « Illumina's 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation file », mais l'avons adapté en utilisant les profils PCR décrits dans Phipps (2014) ainsi que les amorces g et h avec adaptateurs développées par Taberlet et al. (2007). Nous avons réalisé deux répliques PCR pour chacun des 155 fèces, totalisant ainsi 310 échantillons. Nous avons ensuite utilisé le QIAxcel (Qiagen) pour quantifier les concentrations en ADN amplifié de chaque échantillon. En tenant compte des concentrations obtenues, nous avons préparé des mélanges contenant des quantités approximativement similaires des produits PCR de chacun des échantillons fécaux. Finalement, un séquençage NGS de type Miseq Illumina a été réalisé avec ces mélanges, à la plateforme GIGA (ULg).

2.3.7.5 Analyse des séquences : Assignations taxonomiques et étapes de filtrage

Tout d'abord, les séquences issues du séquençage NGS ont été séparées les unes des autres grâce au système de « tagging » qui avait été mis en place. Ensuite, en collaboration avec Arthur Boom, nous avons réalisé plusieurs étapes de traitements bio-informatiques avec OBITools (Boyer *et al.*, 2016). Les différentes commandes utilisées dans OBITools, ainsi que les étapes de filtrages des séquences, sont détaillées dans la section « Methods » du Chapitre 3 de cette thèse.

2.3.8 Description de la végétation du site d'étude

Au cours de notre étude, nous avons réalisé une description de la végétation disponible au sein du Lot 6 du *LKWS*, en utilisant la méthode des plots. A l'aide du logiciel QGIS, nous avons tracé des lignes orientées ouest-est, espacées de 750 m. Sur ces lignes, nous avons disposé 21 plots de 2 500 m² (50 m x 50 m), également espacés de 750 m. Par la suite, nous avons établi quatre plots additionnels, entre les lignes tracées, à une distance minimale de 450 m des autres plots, afin d'échantillonner la

végétation à diverses distances des sources d'eau (ex : fleuve, méandres, affluents). Au total, nous avons établi 25 plots botaniques, soit une surface totale de 6,25 hectares : 10 plots se situent à < 250 m des sources d'eau, et 15 entre 250 m et 1 km (Figure 30).

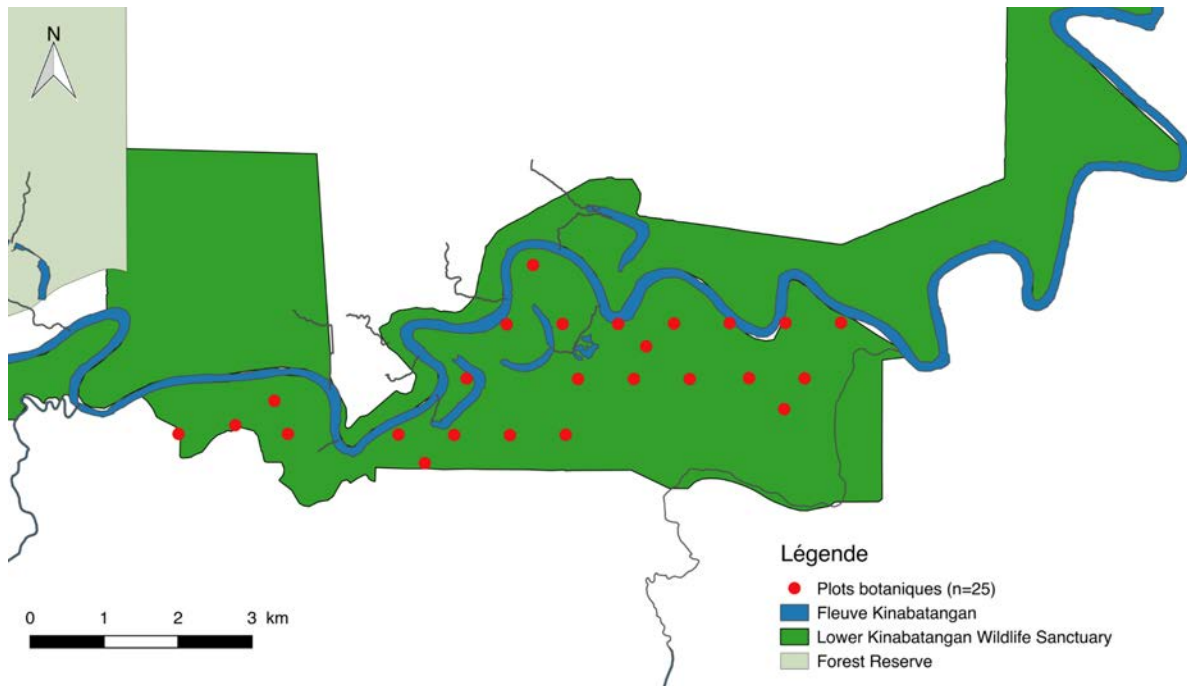


Figure 30. Carte du site d'étude présentant la localisation des 25 plots botaniques

Pour tracer ces plots, nous nous sommes rendus au point GPS que nous avons créé sur QGIS ; il constituait le centre du plot (en rouge sur la Figure 31). Nous avons ensuite utilisé une boussole ainsi qu'une boîte topofil (déroulant du fil) pour tracer les différents axes du plot. Depuis le centre du plot, nous avons d'abord commencé par marcher 25 mètres dans les quatre directions cardinales (lignes pleines de la Figure 31). Ensuite, nous avons établi les quatre coins du plot. Pour ce faire, depuis les deux extrémités de l'axe ouest-est du plot, nous avons marché 25 mètres vers le nord et vers le sud (lignes en traits sur la Figure 31). Finalement, nous avons tracé les bordures nord et sud du plot en reliant les quatre coins aux extrémités de l'axe nord-sud (lignes en pointillés sur la Figure 31). A chaque extrémité, nous avons coupé le fil et l'avons attaché à un bois.

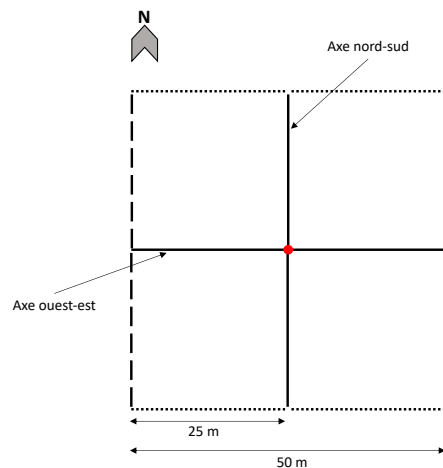


Figure 31. Illustration d'un plot de 50 m sur 50 m et des différents axes tracés au fur et à mesure

Dans chaque plot, nous avons alors recensé chaque arbre (Diameter at Breast Height, DBH $\geq$ 10cm) et liane (DBH $\geq$ 5cm) et les avons identifiés jusqu'à l'espèce. Quand l'identification sur place n'était pas possible, nous avons collecté un rameau que nous avons envoyé au *FRC* (Sandakan), afin qu'il soit identifié par des experts botanistes (Dr. Joan T. Pereira et ses collègues). Au total, 4 457 plantes ont été recensées au sein des 25 plots : 3 342 arbres et 1 115 lianes, appartenant à 174 espèces, 116 genres et 51 familles (voir Annexe 1).

2.3.9 Suivis phénologiques

Pour réaliser les suivis phénologiques au cours de notre étude, nous avons utilisé 25 plots botaniques de 400 m² (20 m x 20 m) établis entre 2011 et 2013 par Dr. Danica Stark, dans le cadre de son projet de doctorat (Stark, 2018). Dans chaque plot, les arbres (DBH > 10 cm) et lianes (DBH > 5 cm) étaient taggés (numérotés) et identifiés jusqu'à l'espèce. Ces plots étaient répartis dans les Lots 5, 6 et 7 du *LKWS* (Figure 32) et comprenaient 585 plantes, appartenant à 92 espèces, 66 genres et 35 familles (Annexe 2). Avec l'aide de deux assistants de recherche, nous avons parcouru ces 25 plots mensuellement (pendant quatre jours, chaque 3^{ième} semaine du mois), lors de nos deuxième et troisième missions de terrain.

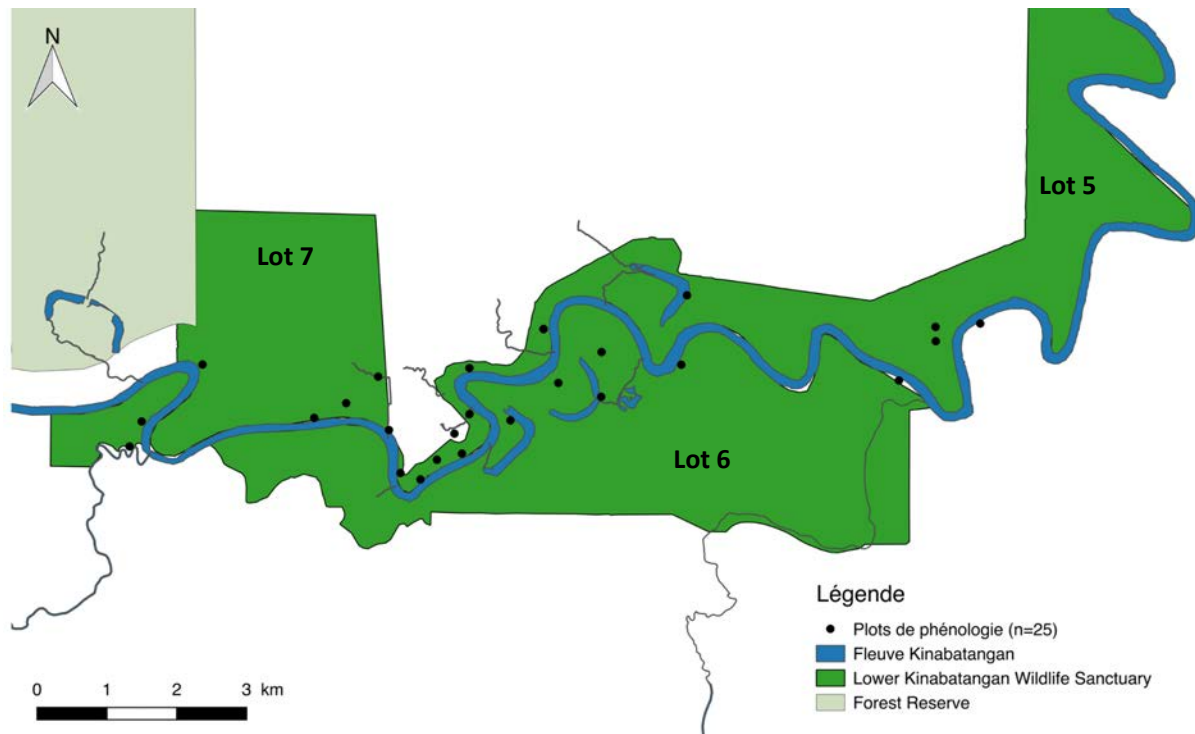


Figure 32. Carte du site d'étude indiquant la position des 25 plots de phénologie au sein des Lots 5, 6 et 7

Pour chaque arbre et liane, nous avons relevé la présence ou l'absence de jeunes feuilles, fleurs (bourgeons / ouvertes) et fruits (immatures / mûrs) ; c'est-à-dire les parties végétales consommées par les nasiques (Matsuda *et al.*, 2009b). Cette méthode binaire (présence-absence) nous a permis d'éviter un biais inhérent aux observateurs et à leurs propres estimations des abondances de nourriture. Nous avons dès lors calculé un indice mensuel d'abondance potentielle en nourriture en divisant le nombre d'arbres et de lianes portant des jeunes feuilles, fleurs ou fruits par le nombre total d'arbres et de lianes au sein des 25 plots.

2.3.10 Analyses nutritionnelles

Pour cette partie de notre projet de recherche, nous avons concentré nos analyses sur 10 espèces de plantes consommées par les nasiques dans notre site d'étude. Listées dans le Tableau 3 ci-dessous, elles constituent plus de 80% des observations de nutrition des nasiques en bordure de fleuve (données collectées depuis le bateau, voir point 2.3.3). De plus, 8 d'entre elles correspondent certainement aux taxons (genres et familles) fréquemment détectés dans les fèces de nasiques par *DNA metabarcoding* (Chapitre 3). Afin de mieux comprendre l'écologie alimentaire du nasique dans le LKWS, nous avons étudié si la composition nutritionnelle des jeunes feuilles : 1) variait au sein des 10 espèces sélectionnées en bordure de fleuve ; 2) différait de celle des fruits immatures ; et 3) variait en fonction de la distance au fleuve Kinabatangan. Dès lors, pour chacune des 10 espèces sélectionnées, nous avons collecté des jeunes feuilles d'arbres et de lianes situés en bordure de fleuve (≤ 50 m). Pour deux espèces, nous avons également collecté des fruits immatures dans des arbres situés en bordure du fleuve. Et pour

cinq espèces, des jeunes feuilles ont également été collectées dans des arbres ou lianes situés à plus de 250 m du fleuve (Tableau 3).

Tableau 3. Liste des 10 espèces de plantes consommées par les nasiques dans le site d'étude et nombre d'arbres ou lianes échantillonnés pour les analyses nutritionnelles et minérales

Espèce	Jeunes feuilles en bordure du fleuve	Jeunes feuilles à >250m du fleuve	Fruits immatures en bordure de fleuve
<i>Bridelia stipularis</i>	8	5	
<i>Colona serratifolia</i>	8	5	
<i>Dillenia excelsa</i>	4	7	
<i>Ficus fistulosa</i>	8		
<i>Ficus racemosa</i>	8		8
<i>Lophopyxis maingayi</i>	8	6	
<i>Nauclea orientalis</i>	8		8
<i>Octomeles sumatrana</i>	8		
<i>Pterospermum elongatum</i>	6		
<i>Vitex pinnata</i>	8	5	

Lors de notre troisième mission de terrain (de décembre 2016 à février 2017), nous avons procédé à la collecte de ces échantillons. Pour ce faire, nous avons pris le bateau et nous nous sommes arrêtés lorsque nous détectons l'une des dix espèces d'intérêt en bordure de fleuve, ou nous avons marché dans la forêt (> 250 m du fleuve) à la recherche d'une des cinq espèces d'intérêt. À l'aide d'un sécateur disposé à l'extrémité d'une perche, nous avons collecté approximativement 100 g de jeunes feuilles ou fruits immatures dans chaque arbre ou liane sélectionné (Tableau 3). De retour au Centre de recherche, nous avons pesé les échantillons, les avons placés dans des sacs en papier et les avons ensuite disposés dans un four à 40°C pendant approximativement 72 heures. En mars et avril 2017, nous avons séjourné deux mois à Kota Kinabalu (Sabah) pour effectuer les analyses nutritionnelles (concentrations en protéines, fibres, lipides et tannins) et minérales (Calcium, Cuivre, Magnésium, Manganèse, Potassium et Zinc) des 118 échantillons collectés, dans le laboratoire du Professeur Charles S. Vairappan à l'*Institute for Tropical Biology and Conservation (ITBC, UMS)*. Ces analyses sont détaillées dans le Chapitre 5 de la thèse.

2.3.11 Interactions animales avec *Nauclea orientalis*

Pour étudier les interactions des espèces animales avec *Nauclea orientalis* – une espèce d'arbre abondante le long des rives du fleuve Kinabatangan – nous avons utilisé deux méthodes de recensement : les observations directes lors de sorties en bateau et les *camera traps*. Cette étude a été réalisée avec Oriana Bhasin (Master 2, ULB), qui est venue sur le terrain de décembre 2016 à mars 2017 et dont nous avons conçu et supervisé la recherche.

2.3.11.1 *Observations directes*

En janvier 2017, nous avons réalisé des sorties en bateau le long d'un transect de 8 km sur le fleuve Kinabatangan. Ces sorties étaient effectuées à heures différentes, du jour et de la nuit : 6-8 h, 8-10h, 10-12h, 12-14h, 14h-16h, 16h-18h et 20-22h. A l'aide de jumelles, nous (avec un second observateur), parcourions le transect en regardant les rives opposées du fleuve, à la recherche d'animaux interagissant avec *N. orientalis*. A chaque espèce détectée, nous avons arrêté le bateau et relevé les données suivantes : rive (nord ou sud), nom de l'espèce animale, nombre d'individus, position dans l'arbre (bas, bas-milieu, milieu, milieu-sommet, sommet), comportement (repos, nutrition) et la quantité de fruits dans l'arbre (abondance estimée de 0-3).

2.3.11.2 *Camera traps*

De décembre 2016 à mars 2017, nous avons disposé des *camera traps* dans des arbres de l'espèce *N. orientalis* (N=12), sur les rives nord et sud d'un transect de 8km établi le long du fleuve Kinabatangan. Pour grimper, nous devions tirer une corde dans l'arbre. Equipée d'un casque, baudrier, de grigris (Petzl) et de cordes (Petzl), nous (Oriana Bhasin) avons grimpé dans chaque arbre sélectionné et avons attaché deux *camera traps* (Reconyx HyperFire PC800 and HC500) au tronc de chacun d'eux (position : milieu-sommet), à l'exception de quatre arbres pour lesquels seule une caméra fut fixée. Les cameras étaient orientées de sorte à viser une branche portant beaucoup de fruits. Deux semaines après la pose de chacune des caméras, nous regrimpions dans les arbres pour changer les cartes SD, ainsi que les piles.

En mars 2017, nous avons également disposé des *camera traps* au niveau du sol. Elle étaient attachées au tronc d'arbres *N. orientalis* (N=3) et faisaient face aux fruits tombés sur le sol. Deux caméras étaient disposées par arbre, à l'exception d'un arbre pour lequel seule une caméra fût activée. Les nombres de jours couverts par chaque caméra sont détaillés dans le Table 18 du Chapitre 7.

3 Régime alimentaire de *Nasalis larvatus* au sein de la plaine Kinabatangan



Le chapitre 3 fournit les premières données alimentaires de plusieurs groupes de nasiques vivant au sein des blocs forestiers 5, 6 et 7 du *LKWS*. Il décrit notamment l'utilisation d'une nouvelle méthode non-invasive, le *DNA metabarcoding*. Déjà utilisée pour décrire le régime alimentaire de quelques espèces de primates, elle est appliquée ici pour la première fois chez *Nasalis larvatus*. En nous appuyant également sur les données collectées par une seconde méthode plus traditionnelle (observations comportementales directes), nous avons pu établir une liste d'espèces végétales consommées par les nasiques dans cet habitat. Nous mettons en évidence que le régime alimentaire de *N. larvatus* est diversifié et présente des variations saisonnières. De plus, nous décrivons les avantages et inconvénients des deux méthodes. Finalement, nous soulignons l'importance de considérer certaines espèces végétales dans les futurs plans de conservation, tels que la restauration des habitats riverains et l'établissement de corridors forestiers.

Ce chapitre correspond à un article en préparation :

Thiry V, Boom A, Stark D J, Hardy O J, Beudels-Jamar R C, Vercauteren Drubbel R, Nathan SKSS, Vercauteren M, Goossens B. **(in prep.)** Using DNA metabarcoding and direct behavioural observations to identify the diet of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in the Kinabatangan Floodplains

Using DNA metabarcoding and direct behavioural observations to identify the diet of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in the Kinabatangan Floodplains

Authors:

Valentine Thiry^{1,2,*}, Arthur Boom³, Danica J. Stark^{4,5}, Olivier J. Hardy³, Roseline C. Beudels-Jamar², Régine Vercauteren Drubbel¹, Senthilvel K.S.S. Nathan⁶, Martine Vercauteren¹, Benoit Goossens^{4,5,6,7*}

¹Anthropology and Human Genetics Unit, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

²Conservation Biology Unit, O.D. Nature, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels, Belgium;

³Evolutionary Biology and Ecology Unit, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

⁴Danau Girang Field Centre, c/o Sabah Wildlife Department, Kota Kinabalu, Malaysia;

⁵Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Sir Martin Evans Building, Cardiff, UK;

⁶Sabah Wildlife Department, Kota Kinabalu, Malaysia;

⁷Sustainable Places Research Institute, Cardiff University, Cardiff, UK 

* Corresponding authors

Valentine Thiry: valentinethiry89@gmail.com , 0032473563831

Benoît Goossens: goossensbr@cardiff.ac.uk, 0060128364005

3.1 Abstract

Characterizing the feeding ecology of threatened species is essential to establish appropriate conservation strategies. In this study, we aimed to determine the diet of multiple proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) groups inhabiting the riverine forests of the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary (LKWS), in Sabah, Malaysian Borneo, by using two methods. First, we conducted boat-based direct observations (scan and *ad libitum* sampling) and identified 67 plant species consumed by the monkeys at their sleeping sites in early mornings and late afternoons. Secondly, we used the DNA metabarcoding approach, based on next-generation sequencing (NGS, MiSeq Illumina) of faecal samples (n=155), using the short chloroplast sequence, the trnL (UAA) P6 loop. In addition, we built a DNA reference database with the local plants available in the LKWS. With the DNA metabarcoding method, 100 plant taxa were detected as being consumed by proboscis monkeys. When combining feeding data from both methods, we reported a diverse dietary ecology in proboscis monkeys, with at least 89 consumed plant taxa, belonging to 76 genera and 45 families. Moreover, we were able to add 22 new genera as part of the diet of this endangered colobine primate in the LKWS. To conclude, this study contributed to enhance the knowledge on the feeding ecology of proboscis monkeys. The two methods provided congruent and complementary results, both having their advantages and limitations. Finally, this study highlighted the significance of several plant species that should further be considered in habitat restoration plans or corridor establishment.

Keywords

Feeding, Faeces, DNA metabarcoding, Chloroplast trnL (UAA), Direct observations

3.2 Introduction

Accurate knowledge of the diet of endangered animal species is essential to develop appropriate conservation strategies (Moreno-Black, 1978; Primarck, 1993). For herbivores, identifying which plant species are eaten is useful to target the plants that should be favored in further conservation and management plans (Chapman *et al.*, 2004; Cristóbal-Azkarate & Arroyo-Rodríguez, 2007; Felton *et al.*, 2010). There are numerous direct and indirect, invasive and non-invasive, methods to study diet composition of wild animals (Ortmann *et al.*, 2006). The simplest way is the direct observation of feeding behaviour, though this method is not an easy task with elusive or nocturnal animals, or in difficult field conditions (e.g., inundated forest, many vines) (Valentini *et al.*, 2009). In the latter cases, researchers should use a multidisciplinary approach, combining non-invasive indirect methods that provide complementary feeding data (Ortmann *et al.*, 2006). In fact, faecal analyses are good alternative approaches unveiling herbivorous diets (Valentini *et al.*, 2009), which can take diverse forms: (1) microhistological analyses examining plant cuticular fragments (Holechek *et al.*, 1982; Bertolino *et al.*, 2009; Soininen *et al.*, 2009); (2) alkane profiles of plant cuticular wax (Dove & Wayes, 1996); (3) near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) (Foley *et al.*, 1998; Kaneko & Lawler, 2006); and (4) DNA-based analyses coupled with either next-generation sequencing (NGS) targeting specific or universal primers (DNA metabarcoding) (Valentini *et al.*, 2009), or direct shotgun sequencing (metagenomics) (Srivathsan *et al.*, 2016). Previous studies reported that DNA-based analyses provided diet data consistent with results obtained using direct behavioural observations (Quéméré *et al.*, 2013; Srivathsan *et al.*, 2016).

DNA metabarcoding refers to the identification of multiple species from a sample containing degraded DNA (e.g., faeces, soil, etc.); its emergence has been facilitated by the development of new sequencing technologies (Taberlet *et al.*, 2012). The method has already been used successfully to determine the diet of a large number of herbivores (Pegard *et al.*, 2009; Soininen *et al.*, 2009; Rayé *et al.*, 2011; Hibert *et al.*, 2013; Kartzinel *et al.*, 2015; Moorhouse-Gann *et al.*, 2018). At first, the chloroplast mini-barcode *rbcL* was initially used in studies using degraded DNA (i.e., coprolites or faeces) (Poinar *et al.*, 1998; Bradley *et al.*, 2007), but it only allowed identification to the family level (Taberlet *et al.*, 2007). Since then, the most commonly used DNA barcode in herbivory studies is the P6 loop of the chloroplast *trnL* (UAA) intron, a short DNA fragment [10-143 bp] designed by Taberlet *et al.* (2007) [see Moorhouse-Gann *et al.* (2018)]. It exhibits several suitable features for metabarcoding studies, though its taxonomic resolution is limited. First, the sequences used for primers design (g and h primers) are extremely well conserved among spermatophytes, allowing for universal PCR amplification for a large number of plant taxa. Second, PCR amplifications are robust even for degraded DNA. Finally, *trnL* (UAA) intron sequences are among the most readily available chloroplast sequences in public databases, potentially allowing taxonomic identification until the genus or species level (Taberlet *et al.*, 2007). As an alternative to plastid DNA, the first and second internal transcribed spacers

of nuclear ribosomal DNA (ITS₁ and ITS₂) were recently used to carry out diet analyses on the Italian hare (*Lepus corsicanus*), stock doves (*Columba oenas*), and Telfairs' skinks (*Leiopisma telfairii*), providing unprecedented taxonomic resolution (Buglione *et al.*, 2018; Moorhouse-Gann *et al.*, 2018). However, to reach such high taxonomic resolution, a comprehensive reference DNA database containing the sequences of most plants available in a site is indispensable (Valentini *et al.*, 2009).

As a powerful non-invasive technique, the DNA metabarcoding can provide dietary information for large numbers of individuals simultaneously, contributing to increased knowledge on feeding ecology at a population scale (Quéméré *et al.*, 2013). However, it also presents some limitations. Indeed, the method is not appropriate for the quantification of herbivorous diets. It does not allow to identify which plant part has been consumed, and as the method is mostly based on chloroplast genes (i.e., *rbcL*, *trnL*), plant species from which chloroplast-rich items are consumed (e.g., leaves or stems) may be overrepresented, as compared to species mostly eaten for their fruits, seeds or roots (Bradley *et al.*, 2007; Valentini *et al.*, 2009). Moreover, it is usually not reliable to correlate proportions of DNA sequences retrieved from faeces to the proportions of items ingested by the animal (i.e., proportions of sequences differ from dietary mass proportions) (Deagle *et al.*, 2013).

The proboscis monkey, *Nasalis larvatus*, is an endangered colobine primate endemic to Borneo, where the species inhabits riverine, swamp and mangrove forests (Meijaard *et al.*, 2008). In riverine habitats, proboscis monkeys are highly associated with water bodies, foraging up to 800 m inland from the riverbank during the day and returning to the riverside where they spend the night (Matsuda *et al.*, 2009a), although inland sleeping occurs more as the moon waxes and temperatures are high (Stark, 2018). Therefore, many previous studies were carried out by conducting boat-based surveys in early mornings and late afternoons (Kern, 1964; Kawabe & Mano, 1972; Bennett & Sebastian, 1988; Yeager, 1989; Murai, 2006; Sha *et al.*, 2008; Thiry *et al.*, 2016). However, a recent long-term study using GPS radio-telemetry technology on 10 collared individuals provided comprehensive data on proboscis monkey spatio-temporal habitat use in riverine forests: the mean daily distance travelled was 940 m (mean range: 285 – 2208 m) (Stark, 2018) and monkeys' home range averaged 81 ha (Stark *et al.*, 2017b).

Similar to other colobines, proboscis monkeys have a large sacculated forestomach wherein food fermentation occurs (Nijboer & Clauss, 2006), and therefore they usually avoid feeding on ripe fleshy fruits which are rich in sugar susceptible to fermentation, thus producing gas, with deleterious effects on their digestive system (Waterman & Kool, 1994). Proboscis monkeys mostly consume young leaves, unripe fruits and seeds (Matsuda *et al.*, 2009b). However, most knowledge on proboscis monkey diet is provided by short-term studies (Kern, 1964; Kawabe & Mano, 1972) or is restricted to the riverside (Salter *et al.*, 1985; Bennett & Sebastian, 1988; Yeager, 1989), except for the studies conducted by Boonratana (2003) and Matsuda *et al.* (2009b) in Sabah. The latter is the most comprehensive study describing the diverse and flexible diet of proboscis monkeys in riverine habitat (n=188 consumed plant

species), although this study was only based on seven adult proboscis monkeys belonging to one single habituated group (Matsuda *et al.*, 2009b).

In this paper, we aimed to report the diet composition of multiple groups of non-habituated proboscis monkeys, inhabiting the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary in Sabah, Malaysia, based on two methods: direct behavioural observations and DNA metabarcoding using trnL. Revealing the diet of the proboscis monkey using DNA metabarcoding is a considerable challenge, especially in regard to the highly diverse diet of this colobine (i.e., 188 food plants (Matsuda *et al.*, 2009b)) and its long mean gut retention times (MRTs of 40 hours (Matsuda *et al.*, 2015)), potentially resulting in high DNA degradation (Srivathsan *et al.*, 2016). DNA metabarcoding has already been used to determine the diet of several colobine species [the Douc langur (*Pygathrix nemaeus*) (Srivathsan *et al.*, 2014), banded leaf monkey (*Presbytis femoralis*) (Srivathsan *et al.*, 2016), and black and white colobus monkeys (*Colobus guereza*) (Bradley *et al.*, 2007)], as well as of some folivorous and/or frugivorous primates, such as golden-crowned sifakas (*Propithecus tattersalli*) (Quéméré *et al.*, 2013), Western gorillas (*Gorilla gorilla*) (Bradley *et al.*, 2007), and bonobos (*Pan paniscus*) (Boom, unpubl.).

In this study, we carried out numerous feeding observations of proboscis monkeys when refuging at their sleeping site along the Kinabatangan River, while also conducting a comprehensive sampling of proboscis monkey fresh faeces, over a wide study area, in parallel to building a local DNA reference database with the plants available in our study site. Firstly, we described the proboscis monkey diet data obtained by each of the two methods, listing the plant species consumed. As proboscis monkey diet is reported to change seasonally, in relation to food availability (Yeager, 1989; Matsuda *et al.*, 2009b), we looked for diet variation between seasons. Then, we compared the consistency of the plant taxa detected by both methods. Based on previous diet studies comparing DNA metabarcoding method to traditional techniques (field observations or microhistology) (Soininen *et al.*, 2009; Srivathsan *et al.*, 2016), we would expect to record more plant taxa by DNA metabarcoding than by direct behavioural observations, especially in regard to the restricted riverine location of our direct observations in comparison to DNA-based analyses using faecal samples, potentially covering whole day feeding events (i.e., riverside and inland forest habitats). However, taking the low discriminant power of the trnL P6 loop into account, we would expect the taxonomic resolution to be lower using the DNA metabarcoding approach than the direct behavioural observations. Finally, we combined feeding data obtained by both methods and discussed our approach by comparing our results to previous studies describing proboscis monkey diet in a proximate study site [Sukau, in Boonratana (2003) and Matsuda *et al.* (2009b)].

3.3 Methods

3.3.1 Study site

This study took place over 15 months (May to August 2015, January to June 2016 and November 2016 to March 2017) in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary (LKWS, 5°10'–05°50'N, 117°40'–118°30'E), in Sabah (Malaysian Borneo) (Figure 33). Daily rainfall, minimum and maximum temperatures were measured at the research station. Mean ($\pm$ SD) monthly rainfall averaged 176 ± 118 mm. Below, we will refer to wet season (November to March) where mean monthly rainfall reached 228 ± 134 mm and dry season (April to August) where it reached 117 ± 62 mm. Mean minimum and maximum temperatures averaged 24.5 ± 0.7 and 30.4 ± 1.8 °C, respectively.

3.3.2 Vegetation survey

We conducted a vegetation survey in Lot 6 of the LKWS, using plot-sampling method. Using QGIS, we first drew parallel transect lines (west-east oriented), spaced by 750 m. We then set up 21 plots (50m x 50m) spaced by 750 m, along the transect lines. Four additional plots were finally set up between transect lines, at a minimum distance of 450 m from other previously established plots, in order to carry out vegetation survey at various distances from water sources (i.e., river, tributaries and oxbow lakes). In total, 10 plots were sampled < 250 m from water sources, and 15 were set up between 250 m and 1 km from water sources (Figure 33). In each plot, trees (DBH $\geq$ 10cm) and vines (DBH $\geq$ 5cm) were measured and identified to the species level. When identification on site was not possible, leaf samples were collected and sent to the Forest Research Centre (Sandakan) to be identified by botanical experts. A leaf sample of each plant species was collected to build the local DNA reference database (see below “Building plant DNA databases”).

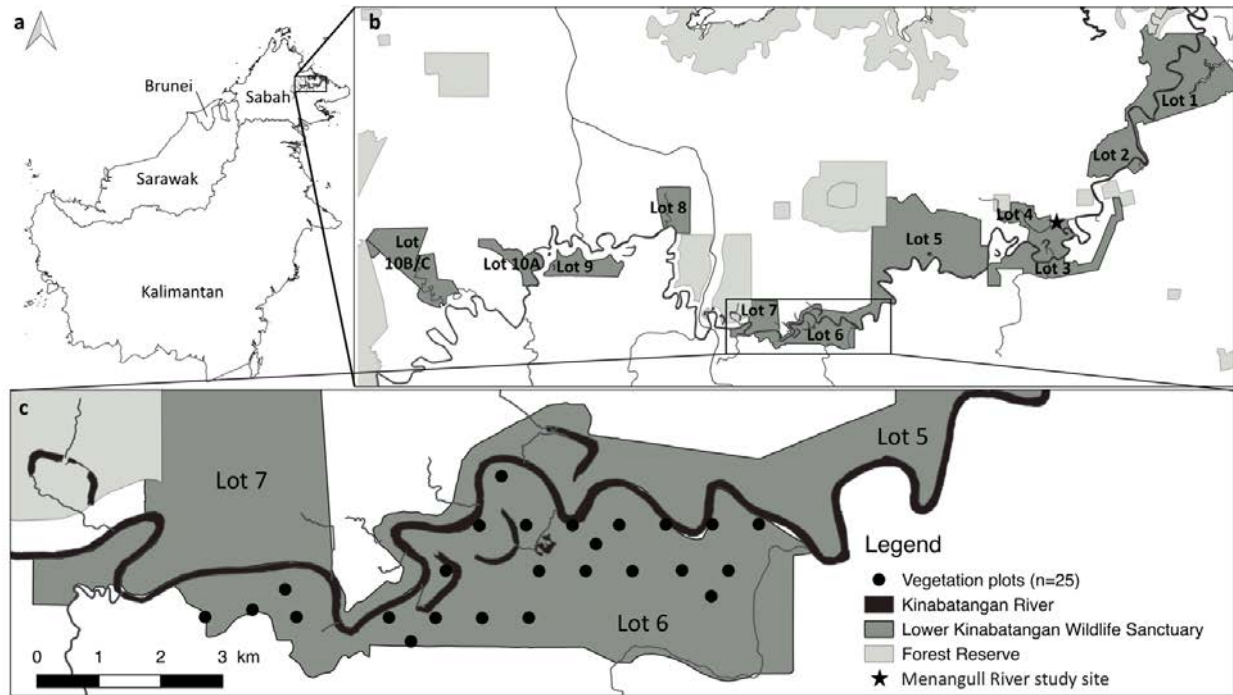


Figure 33. Map of the study area: **a** The island of Borneo with the location of the Kinabatangan Floodplain in the State of Sabah; **b** The Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary with its 10 protected lots (dark grey) and the Forest Reserve (light grey); **c** Zoom on the study site with the Lots 5, 6 and 7 and the location of the 25 vegetation plots inside Lot 6.

3.3.3 Direct behavioural observations

In riparian forests, proboscis monkeys regularly return to the forest edge along rivers, where they sleep at night (Matsuda *et al.*, 2011; but see Stark, 2018). Therefore, in the late afternoon (16.30 h) we conducted boat-based surveys to search for proboscis monkeys settling at their sleeping sites along a pre-established 21 km section of the Kinabatangan River. Over the course of a single month, we aimed to find proboscis monkey groups along different parts of the river in order to cover the whole study site and avoid observing the same groups repeatedly. We selected the first proboscis monkey group that we found and conducted behavioral observations from 17.00 h to 18.00–18.15 h. During the pilot fieldwork (2015), we recorded feeding observations by using *ad libitum* sampling (Altmann, 1974). In 2016 (January to June, November and December) and 2017 (January to March), we used the instantaneous scan sampling method (Altmann, 1974), and recorded each individual behaviour (resting, feeding, moving, other (Matsuda *et al.*, 2009b)) at a 10-min interval. A ‘feeding occurrence’ was defined as a record of a scanned individual observed eating. Between scan intervals, we used the *ad libitum* sampling method to record potentially shorter and rarer feeding events that may occur between two consecutive scans. The following morning (from 6.00 h to 7.00 h), we conducted additional behavioural observations on the same group. After the group left the riverside, we identified the plant species (tree, vine, herbaceous plant) the individuals had been observed feeding on. When we were not immediately able

to identify the plant to the species level, we sampled the leaves and sent them to the Forest Research Centre (Sandakan, Sabah) to be identified by botanical experts. A leaf sample of each feeding species was collected to build the local DNA reference database (see below “Building plant DNA databases”).

3.3.4 DNA metabarcoding method

In this study, the metabarcoding approach was used to compare DNA sequences (trnL (UAA)) retrieved in proboscis monkey faeces to two DNA references databases: global and local. Indeed, the concomitant use of a global and local databases has been shown to improve taxonomic resolution [i.e.; in Quéméré *et al.*, (2013)].

3.3.4.1 Building plant DNA databases

The global “EMBL database” was built by extracting 16,711 trnL sequences from the EMBL library (release 129) using the ecoPCR program (Ficetola *et al.*, 2010). To build the local “LKWS database”, we sampled 475 plants (n=242 species) in the study site. These plants were available in botanical plots (i.e., our 25 botanical plots, phenology plots (Stark, 2018), etc.), observed to be consumed by proboscis monkeys at the riverside, or randomly encountered in the study site (e.g., during forest walks). Voucher specimens were collected for each plant and deposited at the Herbarium of the Université libre de Bruxelles (BRLU). In addition, for each sample, a leaf was stored in silica gel until DNA extractions. NucleoSpin 96® Plant II Kit (Macherey-Nagel) was used to extract total plant DNA from 20mg of dried plant material, following the manufacturer’s manual. DNA extracts were amplified using universal c-d primers (c: 5’-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3’; d: 5’-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3’), amplifying the whole chloroplast trnL (UAA) intron (Taberlet *et al.*, 1991). Sequencing reactions were performed both in forward and reverse using Big Dye v.3.1 chemistry (Applied Biosystems). The products were sequenced on a 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Finally, for each plant, a shorter fragment of the trnL intron (the P6 loop sequence, 10-143 bp (Taberlet *et al.* 2007)) was extracted and used to build the local reference database. Sequence alignments, editing, and assembling were performed in CodonCode Aligner software (version 7.0.1, CodonCode Corporation). Some sequences could not be included in the local “LKWS database”, as their amplification or sequencing had failed (e.g., *Garcinia parvifolia*, *Nauclea subdita*, etc.). In total, the local “LKWS database” includes 205 plant species, belonging to 146 genera and 61 families, and is available on GenBank (accession numbers to be confirmed).

3.3.4.2 Faecal sampling

In the morning, we searched for proboscis monkey faeces under their sleeping trees. Proboscis monkey faeces were easily identifiable, generally properly shaped and soft (Nijboer, 2006) and spread out on leaves or on the ground. When sympatric diurnal primates spent the night in or neighbouring

(within 10 m) proboscis monkeys' sleeping trees, we did not collect faecal samples. Two faecal samples were collected per group and stored in empty tubes. Back at the research station, one sample was manually analysed to look for intact seeds (see Thiry *et al.*, 2019), the other was kept for DNA analysis and stored using the two-step method (Nsubuga *et al.*, 2004): in 95% ethanol for 24 hours followed by silica desiccation. Indicating silica gel was replaced every day until the faecal sample was dried. During the study, 155 faecal samples were collected for DNA metabarcoding analyses (mean $\pm$ SD=10 $\pm$ 4 faeces month⁻¹, range=1-12 faeces month⁻¹).

3.3.4.3 DNA extraction from faecal samples

Total DNA was extracted from 25 mg of faecal samples [unsorted faeces, such as recommended in Hibert *et al.* (2013)], using the DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen), and following the manufacturer's instructions. Concentration of DNA extracts was assessed using Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen).

3.3.4.4 Library preparation and sequencing

Library preparation was conducted following the protocol "Illumina's 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation file", but using PCR profiles described in Phipps (2014) and g-h primers with adapters, designed by Taberlet *et al.* (2007), to amplify plant chloroplast trnL (*UAA*). The Illumina workflow consisted in two consecutive PCR, with first PCR used to amplify P6 loop amplicon and second PCR for dual indexing, using Nextera XT Index Kit (Illumina). Two PCR replicates were performed for all faecal samples, reaching a total of 310 samples (n=155 faecal samples and 155 PCR replicates).

Profiles of the different PCR products were checked using the QIAxcel (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Taking into account these DNA concentrations, we finally prepared a mix containing approximately similar PCR product quantities of each faecal sample. Paired-end Illumina Sequencing (MiSeq) was conducted at the GIGA-Genomics platform (Université de Liège) using the MiSeq Reagent Kit v2 (2 x 150 bp).

3.3.4.5 Sequence analyses: Taxon assignment and filtering steps

Illumina sequences were demultiplexed from each other according to their tags (5xx and 7xx). Paired-end reads from faecal DNA were analysed using OBITools and a set of associated programs (Boyer *et al.*, 2016). Paired-end reads were aligned and merged using the *illuminapairedend* program. Primers were identified and removed using the *ngsfilter* program. We only considered sequences with a maximum of two errors on g-h primer sequences. Identical sequences were clustered together, using the *obiuniq* program, saving the information about their occurrences among samples. Sequences shorter than 10 bp, longer than 150 bp, or with an occurrence lower or equal to 10 were deleted, using the

obigrep program. Then, we assigned a status “Head”, “Singleton”, or “Internal” to each sequence, and removed all the “Internal” sequences (potential PCR chimeras) using the obiclean program, as described in Quéméré *et al.* (2013).

The EcoTag program (Pegard *et al.*, 2009) was used for taxon assignation of each sequence, using both the global “EMBL database” and the local “LKWS database”. This program compared sequences from faeces to sequences in both databases and provided similarity scores. The EcoTag program is based on an algorithm that provides a unique taxon (with the best match, i.e., the highest score) to each unique sequence. This unique taxon corresponds to the last common ancestor node in the NCBI taxonomic tree of all the taxids that best matched against the query sequence (Quéméré *et al.*, 2013). For each taxon assignation, we selected the database (local or global) providing the highest best match, choosing preferentially the local database when both databases provided identical assignation scores. When the assignation was conducted with the local database, the sequence was assigned to the species level when the score=1, to the genus level when the score was between 0.98 – 1, and to the family level when the score was between 0.95 – 0.98. When the global database was used for assignation, sequences with scores between 0.95 and 1 were only assigned to the family level (i.e., we never assigned to species or genus level based on global database). Using both databases, sequences with a score < 0.95 were not assigned and were discarded from further analyses.

To exclude the sequences that may result from PCR artefacts or contamination, we applied three filtering steps. Firstly, among the 681 unique sequences or MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Units), we only retained sequences (n=421) occurring in both PCR replicates. Secondly, we only kept sequences that could be assigned to the family level (n=276), removing all sequences with an assignation score < 0.95 (n=125), as well as a few sequences that were only assigned to subclass, order, or “no rank” level (n=20). Finally, to avoid including sequences from species that do not constitute the ordinary diet of proboscis monkey but could result from external contamination (e.g. pollen deposited on faeces) or correspond to rarely ingested plants, we removed all sequences that met the two following conditions: 1) occurrence in < 10% of faecal samples and 2) account for < 1% of the mean read coverage of samples in which these sequences were found (light grey dots in Figure 34). This final filtering step reduced the number of MOTUs that we kept for further diet analyses to 100 (black dots in Figure 34). This filtering approach is conservative, as 85.3 % of unique sequences were eliminated but the large majority of all reads found belonged to one of the 100 MOTUs (c. 82%, see results).

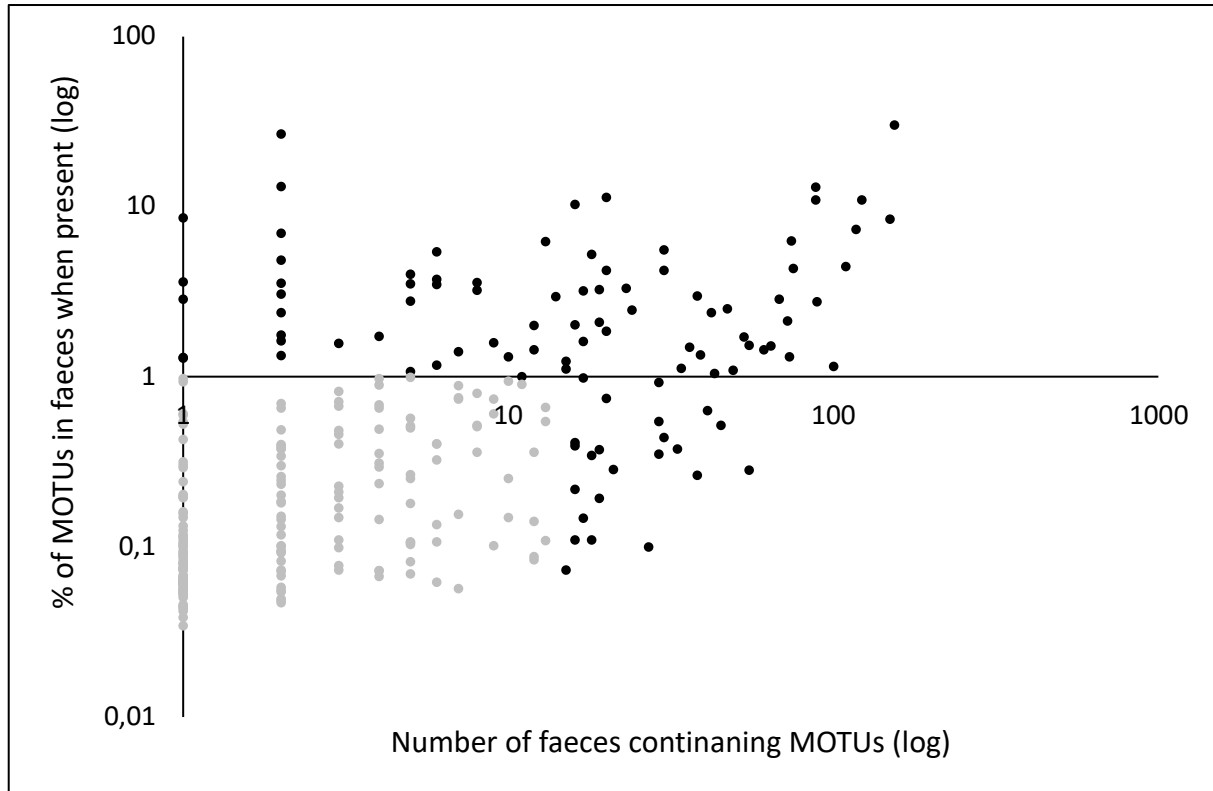


Figure 34. Distribution of the 276 MOTUs according to their occurrence in faeces and their mean proportion of faecal read coverage in samples where they were detected

3.3.5 Statistical analyses

Analyses were conducted with R (version 3.4.3) (R Development Core Team, 2017). Species accumulation curves were used to assess the efficiency of our plant and faecal sampling efforts: we analysed the cumulative number of plant species against the number of botanical plots, as well as the cumulative number of MOTUs against the number of sampled faeces. Species accumulation curves were generated with the *vegan* package (Oksanen *et al.*, 2017), using the *specaccum* function. Total richness was estimated using Chao estimator from the *poolaccum* function. Spearman rank correlations were carried out to test the relation between the number of reads per faecal sample and the richness of detected MOTUs, as well as the relation between the frequency of occurrence (F_o) of plant families in the habitat (plot survey) and the F_o of plant families recorded in faeces, by DNA metabarcoding analyses. To assess seasonal variations, we grouped the same months of different years together (i.e., May referring to May 2015 and May 2016, March to March 2016 and March 2017, etc.). Analyses of variances (Anova or Kruskal-Wallis, according to the distribution of model residuals and the homogeneity of variances) were conducted using the *userfriendlyscience* package (Peters, 2018), to investigate whether the number of MOTUs detected per faecal sample and the total richness of MOTUs varied between study months. To assess whether MOTUs showed a seasonal trend, χ^2 tests were carried out, on Excel version 16.24

(2019), comparing the Frequency of occurrence (F_o) of MOTUs between wet and dry seasons. This analysis only took the abundant MOTUs ($n=65$) occurring in $\geq 10\%$ of faeces into account. We also tested if there was a correlation between the presence-absence (PA) of *Nauclea* spp. seeds in faeces (manual analyses, see details in Thiry *et al.* (2019)), and the PA of corresponding MOTUs (detected by DNA metabarcoding). Although, these two analytical methods were not conducted on identical faecal samples, we compared faeces that belonged to the same proboscis monkey group, and that we collected on the same day, at the same location. By combining feeding data collected by both methods, we generated a list of plant taxa illustrating the overall diet of proboscis monkeys. To assess the congruence and complementarity of the two methods, we plotted Venn diagrams with plant families, genera and species or MOTUs, using the *draw.pairwise.venn* function from the *VennDiagram* package (Chen, 2018).

3.4 Results

3.4.1 Vegetation survey

The vegetation survey covered 6.25 ha (25 plots of 2,500 m²), where 4,457 plants were recorded, including 3,342 trees and 1,115 vines. We recorded 201 plant taxa belonging to at least 174 species, 116 genera and 51 families. The five most abundant plant families were Malvaceae, Dilleniaceae, Euphorbiaceae, Phyllanthaceae, and Lophopyxidaceae, accounting for 55% of all plants. The five most abundant tree species, accounting for 42.6% of all trees, were *Dillenia excelsa* (14.7%), *Mallotus muticus* (10.8%), *Colona serratifolia* (7%), *Antidesma puncticulatum* (5.6%) and *Vitex pinnata* (4.6%). The five most abundant vines, accounting for 70.5% of all vines, were *Lophopyxis maingayi* (41.1%), *Entada rheedii* (10.1%), *Bridelia stipularis* (8.3%), *Dalbergia stipulacea* (7.6%) and *Croton triqueter* (3.4%). The cumulative number of plant species sampled in the 25 botanical plots did not reach an asymptote, showing that species diversity is high in our study site (Fig. 1S in Appendices).

3.4.2 Direct behavioural observations

During the study (instantaneous scan sampling method: 2016-2017), we conducted 93 morning and 109 afternoon surveys along the Kinabatangan River. We carried out 7,391 individual observations: 2,220 in the morning and 5,171 in the afternoon. We recorded a total of 1,668 feeding occurrences, with proboscis monkeys consuming 42 plant taxa, belonging to 23 families, 32 genera and 42 species (Table 1S in Appendices). Leaves accounted for 72% of proboscis monkey feeding occurrences, followed by fruits and flowers (5% and 0.8%, respectively); 22% of feeding items could not be categorized, as we conducted our observations on the opposite riverbank and could not always distinguish the plant part ingested (e.g., the individual shows its back). A seasonal trend was observed in fruit feeding behaviour at the riverside, with proboscis monkeys consuming fruits significantly more often during the wet season

than the dry season ($X^2=14.6$, $df=1$, $p<0.001$). The five most consumed families by proboscis monkeys along the river were the Moraceae, Rubiaceae, Tetramelaceae, Malvaceae, and Lamiaceae. The most consumed species were *Ficus racemosa*, *Octomeles sumatrana*, *Nauclea orientalis*, *Pterospermum elongatum*, and *Vitex pinnata*; with *F. racemosa* accounting for 70% of proboscis monkey leaf-eating occurrences along the riverbanks. Although fruit-eating was rarely observed at the riverside, *N. orientalis* represented the major proportion (88%) of all fruit-feeding occurrences.

By adding *ad libitum* sampling observations between scan intervals and the additional data collected from May to August 2015, we recorded a total of 67 plant taxa that the proboscis monkeys were feeding on at the riverside, belonging to at least 30 families, 48 genera and 62 species (Table 1S in Appendices). The behavioural observation methods provided a high resolution, allowing us to identify 81% and 16% of the consumed plants until species and genus levels respectively, with only two plants remaining unidentified (Figure 37).

3.4.3 DNA metabarcoding method

The next-generation sequencing produced a total of 8,986,271 reads (mean $\pm$ SD=28,988 $\pm$ 8,785 reads per sample ($n=310$), range=224-60,199), corresponding to 681 unique sequences or MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Units). After applying the different filtering steps (see in Methods, Figure 34), 100 MOTUs (Table 2S in Appendices) were retained with 7,299,005 reads, corresponding to 81.2% of the initial total count (mean $\pm$ SD=46,639 $\pm$ 17,187 reads per faecal sample, range=5,137-81,867). Each faecal sample contained on average 19 $\pm$ 8 MOTUs (range=1-39), with no significant difference between months (Anova: $F=1.50$, $df=9$, $p=0.15$). The total richness of MOTUs detected each month did not vary significantly during the study (Kruskal-Wallis: $X^2=14$, $df=14$, $p=0.45$), with an average of 60 ($\pm$ 18 SD) MOTUs detected every month (range: 10 – 77, in June 2016 and July 2015, though only one faecal sample was collected in June 2016).

The mean ($\pm$ SD) length of the 100 recorded MOTUs reached 49 ($\pm$ 8) bp (range=20-68 bp), with no correlation between the sequence length and its occurrence in faeces nor its count of reads (Spearman: $S=180,840$; $\rho=-0.09$; $p=0.4$ and $S=181,620$; $\rho=-0.09$; $p=0.374$, respectively). We found a significant correlation between the total number of reads per faecal sample and the MOTU richness (Spearman: $S=284,363$; $\rho=0.54$; $p<0.001$). We also observed that the frequency of occurrences of families inside the habitat (25 plots) and the frequency of occurrences of families in faeces were significantly positively correlated (Spearman: $S=22,042$; $\rho=0.29$; $p<0.05$).

The cumulative numbers of MOTUs approached an asymptote that was estimated at 106 MOTUs, suggesting that our sampling effort was sufficient to provide reliable information on proboscis monkey diet composition (Figure 35).

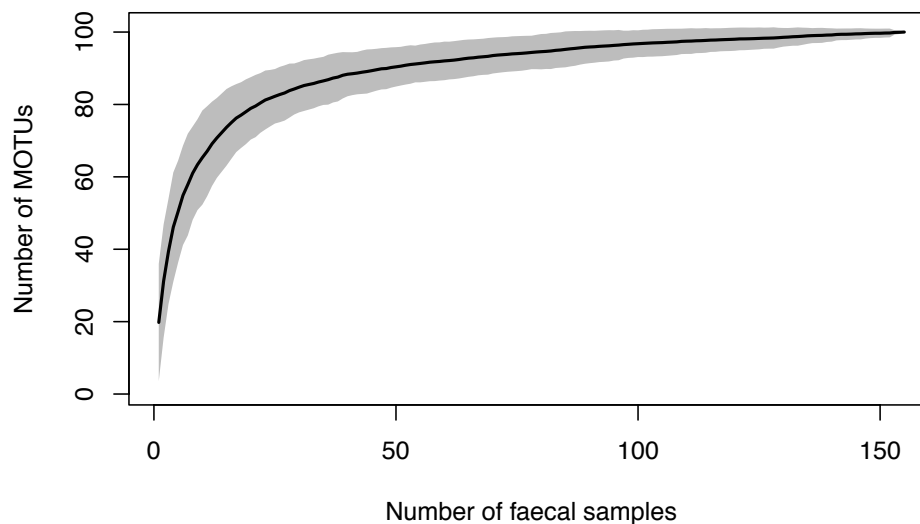


Figure 35. Accumulation curve of plant DNA sequences (MOTUs) found in proboscis monkey faecal samples (n=155) collected in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary between May 2015 and March 2017.

The diet of proboscis monkey included at least 100 different plants, with 70% of MOTUs matching plant sequences available in the local “LKWS database”. By using the two reference databases, 49, 18 and 33% of the 100 MOTUs were identified to the family, genus and species levels, respectively (Figure 37). Plant sequences were assigned to 39 families, 46 genera and 33 species. The top five plants recorded in proboscis monkey faeces belonged to *Bridelia*, *Ficus*, *Octomeles*, *Mallotus* and *Dracontomelon* genera. With a frequency of occurrences of 99%, *Bridelia* 1 (Phyllanthaceae) was the most consumed plant taxa in this study (Table 2S in Appendices). However, we could not assign this sequence to a unique species because the trnL P6 loop was not discriminant within the *Bridelia* genus. The most frequent families were the Phyllanthaceae, Moraceae, Leguminosae, Euphorbiaceae and Tetramelaceae. The Leguminosae family is represented by the highest number of plant sequences (n=14 MOTUs) (Table 3S in Appendices), though only four of them could be identified to species level and the other 10 sequences were only identified until the family level.

The average frequency of occurrences (F_o , = the proportion of faeces containing the MOTU) was 19.5 % ($\pm$ SD=21.3), indicating that on average most plant taxa were found in a fifth of the faecal samples.

Seasonal variation

High numbers of plant taxa were recorded during both seasons, with 89 MOTUs detected from April to August (n=64 faecal samples) and 98 from November to March (n=91 faecal samples). We observed that F_o of MOTUs varied significantly between seasons ($X^2=140.31$, $df=64$, $p<0.001$). Seven of the MOTUs contributed the most to the seasonal trend ($X^2=71.52$, $df=6$, $p<0.001$), with

Poikilospermum suaveolens, *Lagerstroemia speciosa* and *Cayratia trifolia* more consumed during the wet season, and *Entada rheedii*, *Neolamarckia cadamba*, *Dillenia 1* and *Pterospermum 1* during the dry season (Figure 36). The monthly distribution of the frequency of these seven MOTUs is shown in Fig. 2S (in Appendices).

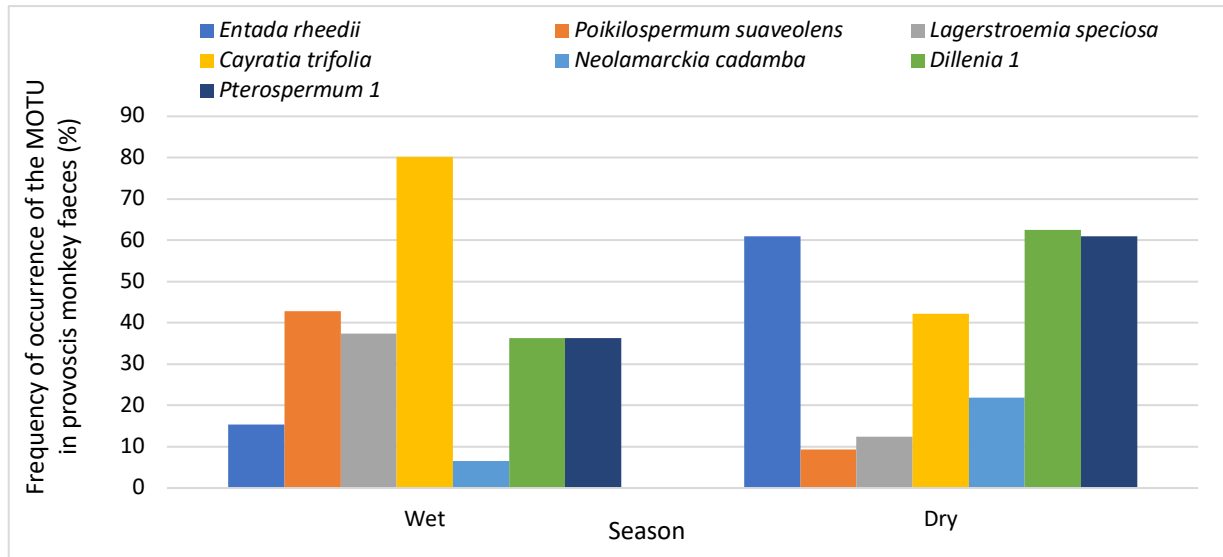


Figure 36. Seasonal variation in the frequencies of occurrences of seven MOTUs detected in proboscis monkey faeces

Correspondence with manual analyses

We did not find any correlation between the presence-absence (PA) of *Nauclea* spp. seeds in proboscis monkey faeces and the PA of Rubiaceae MOTUs in faeces (collected from the same group, the same day and at the identical location) (i.e., trnL was not discriminant among species of the Rubiaceae family) (Spearman: $S=426,040$; $\rho=-0.137$; $p=0.118$). When only taking 75 faecal samples that were collected during months where 100% of manually analysed faeces contained *Nauclea* spp. seeds ($n=7$ months: January to March 2016, and November 2016 to February 2017 (Thiry *et al.*, 2019)) into account, only 42 samples contained one (or more) of the four Rubiaceae MOTUs (potentially corresponding to *Nauclea* genus).

Comparison of methods

Behavioural direct observations showed a higher resolution than DNA metabarcoding methods, as they provided identification to the species level for 81% of consumed plants in comparison to 33% with the DNA metabarcoding method (Figure 37).

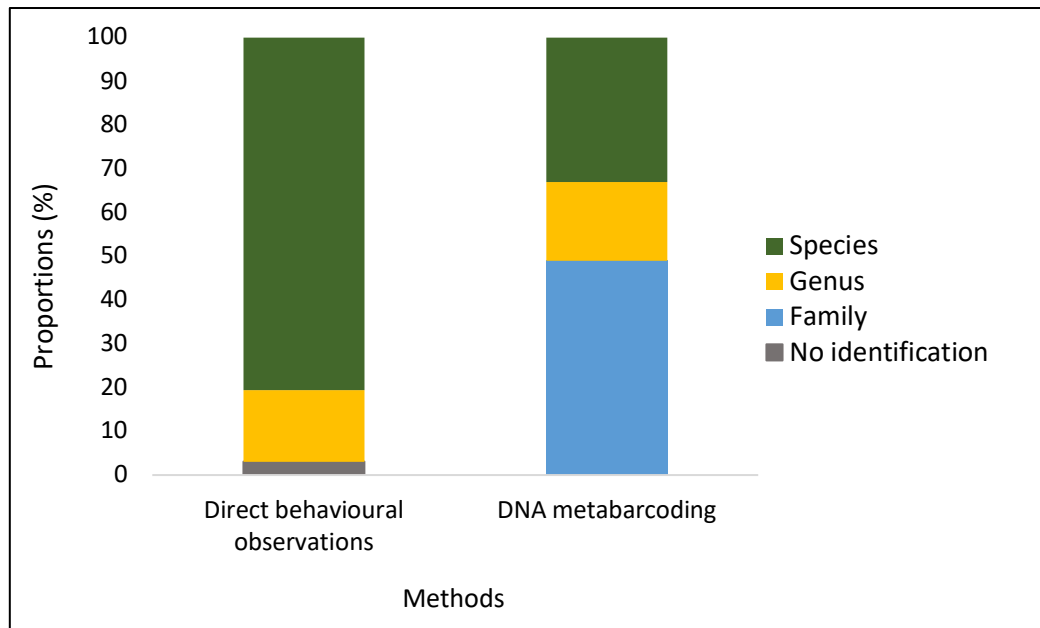


Figure 37. Taxonomic resolution of the diet of proboscis monkeys using two methods (direct behavioural observations and DNA metabarcoding)

The 20 top-key plants recorded by both methods shared three species (*Octomeles sumatrana*, *Dracontomelon dao* and *Cayratia trifolia*) and five genera (*Ficus*, *Mallotus*, *Vitex*, *Dillenia* and *Pterospermum*). Seven genera of the 20 top-key plants identified by direct behavioural observations were not recorded by DNA metabarcoding. However, three such genera (*Nauclea*, *Ludokia* and *Mitragyna*) belong to the Rubiaceae family, where trnL is not discriminant at the genus level, and two other genera (*Garcinia* and *Cleistanthus*) were not available in local and global reference databases. Therefore, only two genera (*Colona* and *Drypetes*) of the 20 top-key plants detected by direct behavioural observations were not recorded by the second method, although available in local and global reference databases, respectively.

Three vine species are listed in the 20 top-key plants recorded by behavioural direct observations, while at least six (potentially seven if considering *Bridelia* 1 to belong to the vine *Bridelia stipularis*, see discussion) are recorded by DNA metabarcoding (Table 4).

Table 4. List of the 20 top-key plants recorded by behavioural direct observations and DNA metabarcoding methods

Rank	Behavioural direct observations			DNA metabarcoding		
	Species	Nb feeding occurrences	Fo	MOTUs	Nb occurrences in faeces	Fo
1	<i>Ficus racemosa</i>	848	0.508	<i>Bridelia l</i>	154	0.994
2	<i>Octomeles sumatrana</i>	195	0.117	<i>Ficus l</i>	149	0.961
3	<i>Nauclea orientalis</i>	178	0.107	<i>Octomeles sumatrana</i>	122	0.787
4	<i>Pterospermum elongatum</i>	104	0.062	<i>Mallotus l</i>	117	0.755
5	<i>Vitex pinnata</i>	39	0.023	<i>Dracontomelon dao</i>	109	0.703
6	<i>Ludekia borneensis</i>	30	0.018	<i>Cayratia trifolia</i>	100	0.645
7	<i>Mallotus muticus</i>	28	0.017	<i>Syzygium l</i>	89	0.574
8	<i>Colona serratifolia</i>	20	0.012	<i>Lophopyxis maingayi</i>	88	0.568
9	<i>Dracontomelon dao</i>	16	0.010	<i>Rubiaceae l</i>	88	0.568
10	<i>Cleistanthus sp.</i>	15	0.009	<i>Leguminosae l</i>	75	0.484
11	<i>Unknown sp.2</i>	12	0.007	<i>Vitex l</i>	74	0.477
12	<i>Ficus crassiramea</i>	11	0.007	<i>Dillenia l</i>	73	0.471
13	<i>Cayratia trifolia</i>	11	0.007	<i>Pterospermum l</i>	72	0.465
14	<i>Dillenia excelsa</i>	10	0.006	<i>Polyalthia l</i>	68	0.439
15	<i>Drypetes sp.</i>	9	0.005	<i>Caesalpinia sp.1</i>	64	0.413
16	<i>Mikania cordata</i>	9	0.005	<i>Derris elegans</i>	61	0.394
17	<i>Mallotus floribundus</i>	6	0.004	<i>Erycibe grandifolia</i>	55	0.355
18	<i>Mitragyna speciosa</i>	6	0.004	<i>Apocynaceae l</i>	55	0.355
19	<i>Garcinia parvifolia</i>	6	0.004	<i>Entada rheedii</i>	53	0.342
20	<i>Unknown sp.1</i>	5	0.003	<i>Lauraceae l</i>	49	0.316

ⁱ Where similar species and genera are indicated in bold

Combining methods: Overall proboscis monkey diet

To combine results from both methods (DNA metabarcoding and direct behavioural observations), we first listed all plants that were identified to the species level. Then, we added plants belonging to a new genus, that had only been identified to the genus level. Finally, we added plants belonging to a new family, that were only identified to the family level. Therefore, by combining both methods, we obtained a total of 89 plant taxa consumed by proboscis monkeys in our study site, belonging to 76 genera (including six unidentified genera) and 45 families (see Table 4S).

We observed that the DNA metabarcoding and direct behavioural observation methods provided congruent, but complementary, results: 24 families, 24 genera and 15 species were identified by both methods. At the family level, the congruence of methods was high with 80% of the families and 50% of the genera identified by direct behavioural observations that were also recorded by DNA metabarcoding.

In fact, the DNA metabarcoding method provided 29 new plant taxa (including 18 identified species), belonging to 28 genera and 15 families, in addition to the first method (Figure 38).

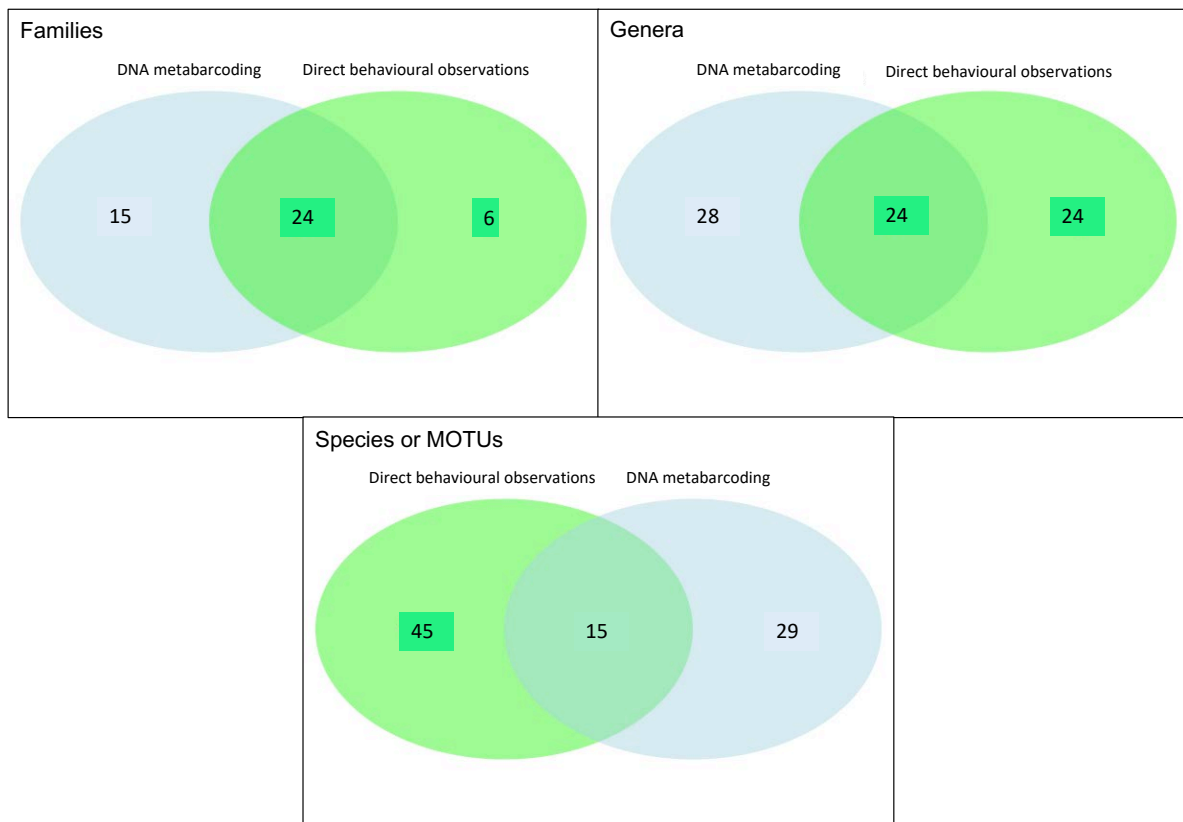


Figure 38. Venn diagrams of plant families, genera and species detected by DNA metabarcoding and direct behavioural observation methods

Among the 18 new species identified as part of proboscis monkey diet, most of them were frequently detected during the study period (i.e., during at least eight months of the study, in a range of 14 – 61 faecal samples), excepted for three species, *Antirhea inaequalis*, *Dimocarpus* sp.1, *Crateva religiosa*, which were rarely found ($n \leq 2$ samples, Table 5).

Table 5. List of the 18 plant species only recorded by DNA metabarcoding method

Family	Species	Number of faecal samples
Burseraceae	<i>Canarium denticulatum</i>	38
Calophyllaceae	<i>Mesua oblongifolia</i>	14
Capparaceae	<i>Crateva religiosa</i>	1
Convolvulaceae	<i>Erycibe grandifolia</i>	55
	<i>Merremia umbellata</i>	23
Cornaceae	<i>Alangium javanicum</i>	15
Lamiaceae	<i>Teijsmanniodendron bogoriense</i>	16
Lauraceae	<i>Cryptocarya ferrea</i>	39
Lecythidaceae	<i>Barringtonia pterita</i>	19
Leguminosae	<i>Derris elegans</i>	61
	<i>Entada rheedii</i>	53
Malvaceae	<i>Microcos crassifolia</i>	29
Phyllanthaceae	<i>Margaritaria indica</i>	20
Rubiaceae	<i>Neolamarckia cadamba</i>	20
	<i>Antirhea inaequalis</i>	2
Sapindaceae	<i>Dimocarpus longan</i>	19
	<i>Dimocarpus</i> sp.1	2
Vitaceae	<i>Tetrastigma lanceolarium</i>	41

3.5 Discussion

Our study reports the diet composition of multiple proboscis monkey groups inhabiting the riverine forests of the LKWS in Sabah, using two analytical methods: direct behavioural observations and DNA metabarcoding.

Direct behavioural observations

Among the 67 plant species recorded by direct behavioural observations at the riverside, *Ficus racemosa* was the most consumed species (accounting for 50.8 % of feeding occurrences). It contrasts with previous studies conducted downriver, where *F. racemosa* was less consumed (Boonratana, 2003; Matsuda *et al.*, 2009b). Nutritional content (i.e. protein), as well as abundance, are known to influence young leaf selection in proboscis monkeys (Matsuda *et al.*, 2013b, 2017). Variations in nutritional content and species abundance between the downriver site and ours may explain these dietary differences. Indeed, *F. racemosa* is a common tree species along the riverbanks of the Kinabatangan River (Azmi, 1998) and shows high quality young leaves [with high crude ash and K content (Thiry in prep.)], which may explain why it was highly consumed during our observation sessions restricted at the riverside. Moreover, both previous studies collected feeding data during the entire day further from waters (Boonratana, 2003; Matsuda *et al.*, 2009b), where *F. racemosa* might occur less frequently.

Using direct behavioural observations, a particularly low level of frugivory – only 5 % of feeding occurrences at the riverside – was recorded, in comparison to previous studies where fruits accounted for 26 % (Matsuda *et al.*, 2009b), 40 % (Yeager 1989) or even 50 % (Bennett & Sebastian, 1988) of proboscis monkey diet. Even among such few frugivory events, more fruit eating was reported during the wet season. Though this result needs to be taken cautiously, as less direct behavioural observations were conducted during the dry season (17% of total feeding occurrences) and a bias may thus exist as a consequence of the differences in sampling efforts between both seasons. The lower fruit-feeding activity in the current study could be explained by the fact that our observation sessions were restricted spatially, to riverbanks, and temporally, to early mornings and late afternoons. Increased fruit-feeding activities might occur inland during the day and therefore be missed during boat-based surveys. Moreover, proboscis monkeys may preferentially feed on leaves at the riverside, at least in the late afternoon as sleep hours can then be devoted to digesting the fibrous materials (Matsuda *et al.*, 2014a). Finally, young leaves were highly available throughout the study period in comparison to fruits and flowers (phenology survey data, Thiry unpubl., see in Annexe 3). Although Bennett and Sebastian (1988) reported more fruit-feeding during boat-based surveys than we did in the current study, their results must be taken cautiously as they recorded very few feeding events (n=34, as opposed to n=1,668 in the current study). Finally, we found strong evidence of fruit-feeding behaviour in proboscis monkeys in a concurrent study, with 77 % of proboscis monkey feces analyzed in the study site that contained intact seeds, with 98 % of the seeds belonging to *Nauclea* spp. (Thiry *et al.*, 2019). The high percentage of faeces containing seeds highlights the significance of fruits in proboscis monkey diet and supports the idea that fruit-feeding may have been missed during our observations at the riverside.

DNA metabarcoding method

Using DNA-based analyses with only about 3.9 g of faecal samples (155 * 25 mg) was sufficient to record 100 plant taxa that proboscis monkeys were feeding on in the LKWS. Each month, 10 to 77 plant taxa were recorded in proboscis monkey faeces. Similar range was reported in a previous study, where proboscis monkeys consumed 36 to 82 plant species each month (Matsuda *et al.*, 2009b).

Recorded in 99% of faecal samples, *Bridelia* 1 is the most abundant MOTU in this study. Two species of *Bridelia* were observed during the vegetation survey: the vine *B. stipularis* and the tree *B. insulana*. As *B. stipularis* is more available (n=92, basal area/ha=648 cm²/ha) than *B. insulana* (n=3, basal area/ha=66 cm²/ha), we could expect *Bridelia* 1 to refer to *B. stipularis* and *Bridelia* 2 to *B. insulana*. Moreover, proboscis monkeys were observed to consume *B. stipularis* during boat-based surveys, and *B. stipularis* seeds were recorded in several monkey faeces (Thiry *et al.*, 2019). The trnL sequence of *Bridelia* 1 is short, with a length of 41 bp. Previous studies reported that short sequences are likely to be over-represented, with short sequences occurring in higher numbers than long sequences

(Deagle *et al.*, 2006; Rayé *et al.*, 2011). However, in the present study, we did not report any correlation between the length of MOTUs and their occurrences in faeces nor their counts of reads.

A positive correlation was reported, at the family level, between plant abundance in the habitat and occurrences in faeces, suggesting that proboscis monkeys feed on most available plants in the study site. Abundance is known to influence plant selection in proboscis monkeys, with the monkeys choosing the most abundant plant species within their preferred food species (Matsuda *et al.*, 2013b). However, we could not test this selection at the genus and species level as almost half of the MOTUs were only identified until the family level. A seasonal trend was mostly observed for seven MOTUs. These species/genera seem to mostly be selected for their leaves, excepted for *Dillenia excelsa* and *Pterospermum macrocarpum* (updated name *P. diversifolium*) highly consumed for their flowers (Matsuda *et al.*, 2009b). However, in our study site, young leaves were highly available throughout the year, but flowers were more abundant in the dry season, and fruits during the wet season (Thiry, unpubl., see Annexe 3). These changes in food (flower) availability throughout the study may explain the seasonal pattern observed for some of the MOTUs (i.e., *Dillenia* 1 and *Pterospermum* 1 were more eaten in the dry season, when flowers were abundant).

Comparison of methods

In this study, higher number of plant taxa was recorded by DNA metabarcoding approach (n=100) than by direct behavioural observation method (n=67), though this latter was only conducted during boat-based surveys in late afternoons and early mornings, only characterizing feeding habits occurring at the riverside. Based on a previous study, where 35 plant taxa were identified as part of the banded leaf monkey, *P. femolaris*, diet, although only six faecal samples were used (Srivathsan *et al.*, 2016), we expected to record large numbers of plants in the 155 faeces of proboscis monkeys.

It is interesting to note that more vines were potentially detected by DNA metabarcoding than by direct behavioural observations. In fact, vine consumption was not always easy to detect during boat-based surveys as we were at a certain distance from the group: feeding bouts on vines might have been missed in the middle of feeding events on tree leaves. Moreover, plant identification was not always possible, especially when feeding vines were high in the tree canopy and no leaves could be sampled for identification. Therefore, we suggest that DNA metabarcoding might be a more appropriate method to record vine species that usually are not easy to detect visually.

Taxonomic resolution was better by direct behavioural observations than DNA metabarcoding, with 81% and 33% of the taxa identified to the species level, respectively. Using DNA metabarcoding, taxonomic resolution until the genus level reached 51% (including 33 MOTUs identified until the species level), which is similar to previous studies, conducted in tropical environments, where genus-level identification reached 40 to 61% of the sequence identifications (Hibert *et al.*, 2013; Quéméré *et al.*, 2013; Srivathsan *et al.*, 2016). Taxonomic resolution could be improved by the use of another

primer, such as the second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS2) (see Moorhouse-Gann *et al.*, 2018).

One of the main bias of DNA-based diet studies remains the impossibility to precise which plant part has been consumed by the animal (Valentini *et al.*, 2009). The presence of Rubiaceae MOTUs (DNA metabarcoding analyses) was not correlated with the presence of *Nauclea* spp. seeds (manual analyses, see Thiry *et al.* (2019)) in faeces collected the same day in a same site. Moreover, of the faecal samples collected during months when all the manually analysed faeces contained *Nauclea* spp. seeds [n=75 samples in seven months (Thiry *et al.*, 2019)], only 56% of the samples analysed by DNA metabarcoding contained at least one of the Rubiaceae MOTUs. This weak correspondence between both methods indicates that plastid markers are not appropriate to record frugivory events, as already reported by (Bradley *et al.*, 2007; Hibert *et al.*, 2013) [though, there are exceptions (Hibert *et al.*, 2013)].

Combining methods: Overall proboscis monkey diet

We obtained a diverse diet profile of the proboscis monkey consisting of at least 89 different plant taxa, from 76 genera and 45 families. A good overlap is reported between the two methods. Indeed, 80% of the families and half of the genera detected by direct behavioural observations were also identified by DNA metabarcoding, with 75 % of the genera recorded in at least a fifth of the faecal samples, including *Ficus*, *Octomeles*, *Pterospermum* and *Vitex* genera that accounted for an abundant part of the feeding occurrences reported by direct behavioural observations at the riverside. In fact, during our boat-based survey, we were more likely to record feeding bouts involving frequently consumed plant species, which were therefore more likely to be detected in large numbers of faecal samples. Similar results were reported in a previous study comparing field data and DNA-based analyses (DNA metabarcoding and metagenomics) to describe the diet of *P. femolaris* in Singapore (Srivathsan *et al.*, 2016). Therefore, we suggest that DNA metabarcoding is a reliable method to unveil the diet of proboscis monkeys in this study, especially in regard to the large number of faeces sampled (n=155), the long duration of the study period (14 months), and the size of the study area (a 21-km river transect, where several proboscis monkey groups range). Moreover, in regard to proboscis monkey long gut retention times, we consider that faecal samples provide information on the plants they consumed few days before defecation (see Quéméré *et al.* (2013)), potentially allowing to retrieve feeding events over rare items. Among the 15 families only detected by DNA metabarcoding, two (Malpighiaceae and Symplocaceae) were not reported in our study site. However, the Symplocaceae family is known to be available in the Kinabatangan floodplain, as well as to be part of proboscis monkey diet in Sukau (Matsuda *et al.*, 2009b); this family has probably been missed during our vegetation sampling. In contrast, there is no evidence of the existence of the Malpighiaceae family in our study site. Finally, among the 18 species only detected by DNA metabarcoding, nine had already been listed as part of proboscis monkey diet in riverine habitats (Matsuda *et al.*, 2009b).

The number of plant taxa (n=89) consumed in our study is in the range reported in two previous long-term studies listing 36 (Boonratana, 2003) and 188 (Matsuda *et al.*, 2009b) plant species being consumed by proboscis monkeys downriver. When comparing the composition of the plant lists obtained in these three studies, we observed overlap and differences. We identified 37% and 43% of the genera identified by Matsuda *et al.* (2009b) (n=47) and Boonratana (2003) (n=10), respectively. We also recorded 22 genera that had not yet been described as consumed by proboscis monkeys in the LKWS (Boonratana, 2003; Matsuda *et al.*, 2009b). Moreover, six of these new genera (*Octomeles*, *Ludekia*, *Colona*, *Mikania*, *Mitragyna* and *Polyalthia*) are of main importance, belonging to the 20 top-key plants detected by direct behavioural observations or DNA metabarcoding. As 84% of feeding occurrences reported in Boonratana (2003) included unidentified species, we will further compare our diet data to the most comprehensive study (Matsuda *et al.*, 2009b) conducted along the Menanggul River (Lot 4 of the LKWS, Figure 33).

Several factors may explain the differences in proboscis monkey diet reported in our study and in Matsuda *et al.* (2009b). Firstly, though both study sites are close from each other (approximately 30 km) and characterized by riverine forests, where *Mallotus* and *Lophopyxis* are common, plant availability differs: while *Croton*, *Excoecaria* and *Eugenia* are abundant genera in the Menanggul riverine habitat, our study site is dominated by *Dillenia*, *Colona* and *Syzygium*. However, sampling methods used to carry out vegetation surveys differ between studies [trail transects in Matsuda *et al.* (2009b), botanic plots here], resulting in plant availabilities that are hard to compare. Cumulative numbers of plant species sampled in both sites did not reach asymptotes, suggesting that plant diversities are high and that further sampling efforts are required.

Secondly, methods used to record feeding data differed between studies: while Matsuda and his colleagues (2009b) conducted continuous focal follows from dawn to dusk, we carried out scan and *ad libitum* sampling restricted at the riverside, in early mornings and late afternoons, not including the entire feeding behaviour of the monkeys. We also used DNA-based analyses to study diet of proboscis monkeys. However, as trnL P6 loop is an appropriate primer targeting chloroplast-rich tissues (i.e., leaves and stems), we suggest that plant species mostly consumed for their fruits or flowers may be detected less often. It is also interesting to note that the number of MOTUs (n=100) we obtained is probably a conservative estimate of proboscis monkey diet. Indeed, we used several filtering steps to remove potential erroneous sequences (i.e., PCR artefacts or contaminations), leading to an elimination of 85.3 % of the unique sequences. These reasons could explain why the plant richness recorded in our study was lower than in Matsuda *et al.* (2009b).

Conclusion

The present study enhances our knowledge on the feeding ecology of proboscis monkeys inhabiting riverine forests of the Kinabatangan floodplain. The two methods used in this study provided

congruent and complementary results, both having their advantages and limitations. While, DNA metabarcoding is a non-invasive tool providing reliable diet assessment for elusive species or non-habituated animals, the method is not very appropriate to infer quantitative information about the relative abundance of consumed plant taxa (Rayé *et al.*, 2011; Deagle *et al.*, 2013), and the importance of species eaten for their fruits may be underrepresented. In addition, plants ingested rarely or accidentally may be overrepresented. Though, considering plant taxa detected in multiple faecal samples should help overcome this bias (Srivathsan *et al.*, 2016). The main advantage of direct behavioural observations remains the possibility to record which plant part is consumed by the individual, as well as to which specific tree or vine it belongs (Srivathsan *et al.*, 2016) (i.e., useful data for further nutritional composition analyses). However, following animals in the field may not always be an easy task (i.e., swamp or inundated forest).

To conclude, whether new technologies, such as DNA metabarcoding, allow to rapidly screen an area to unveil the diet of multiple species (see Kartzinel *et al.*, 2015), we believe spending time in the field to conduct direct behavioural observations (even in spatially and temporally restricted conditions, such as in the present study) still provides undeniable feeding data (i.e.; item consumption, better species resolution). Species of the 20 top-key plants consumed by proboscis monkeys, such as *F. racemosa*, *O. sumatrana*, *N. orientalis*, *Pterospermum elongatum*, *Mallotus muticus*, *Dracontomelon dao* or *Cayratia trifolia* should be considered of high importance when developing future conservation strategies, such as reforestation programs and corridor establishment.

Acknowledgments

We thank the Sabah Biodiversity Centre and the Sabah Wildlife Department for their permission and support to this research. We also thank the Forest Research Centre (FRC) members, especially Dr. Joan Pererra, for the identification of many plant samples. We thank all the financial supporters: the FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique), the Fonds Léopold III – pour l’Exploration et la Conservation de la Nature asbl., and the FNRS Gustave Boël-Sofina Fellowship 2016. We gratefully thank all research assistants and students at Danau Girang Field Centre (DGFC) for their precious help in the field. Special thanks you to Oriana Bhasin for assisting us in the early-morning faeces sampling, Laurent Grumiau and Esra Kaymak for laboratory maintenance and help, as well as Latifa Karim for technical support for the Miseq sequencing (GIGA-Genomics platform).

References

- Altmann, J. 1974. Observational study of behavior: Sampling methods. *Behaviour* **49**: 227–267.
- Azmi, R. 1998. Natural vegetation of the Kinabatangan Floodplain. Part 1: An introduction to its natural vegetation, including a preliminary plant checklist of the region. WWF-Malaysia.
- Bennett, E.L. & Sebastian, A.C. 1988. Social organization and ecology of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in mixed coastal forest in Sarawak. *Int. J. Primatol.* **9**: 233–255.
- Bertolino, S., di Montezemolo, N.C. & Bassano, B. 2009. Food-niche relationships within a guild of alpine ungulates including an introduced species. *J. Zool.* **277**: 63–69.
- Boonratana, R. 2003. Feeding ecology of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in the Lower Kinabatangan, Sabah, Malaysia. *Sabah Park. Nat. J.* **6**: 1–26.
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P. & Coissac, E. 2016. OBITools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* **16**: 176–182.
- Bradley, B.J., Stiller, M., Doran-Sheehy, D.M., Harris, T., Chapman, C.A., Vigilant, L., *et al.* 2007. Plant DNA sequences from feces: Potential means for assessing diets of wild primates. *Am. J. Primatol.* **69**: 699–705.
- Buglione, M., Maselli, V., Rippa, D., Filippo, G. De, Trapanese, M. & Fulgione, D. 2018. Original investigation A pilot study on the application of DNA metabarcoding for non-invasive diet analysis in the Italian hare. *Mamm. Biol.* **88**: 31–42. Elsevier GmbH.
- Chapman, C. a., Chapman, L.J., Naughton-Treves, L., Lawes, M.J. & McDowell, L.R. 2004. Predicting folivorous primate abundance: Validation of a nutritional model. *Am. J. Primatol.* **62**: 55–69.
- Chen, H. 2018. VennDiagram: Generate high-resolution venn and euler plots. R package version 1.6.20.
- Cristóbal-Azkarate, J. & Arroyo-Rodríguez, V. 2007. Diet and activity pattern of howler monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, Mexico: Effects of habitat fragmentation and implications for conservation. *Am. J. Primatol.* **69**: 1013–1029.
- Deagle, B.E., Eveson, J.P. & Jarman, S.N. 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces Bruce. *Front. Zool.* **3**: 1–10.
- Deagle, B.E., Thomas, A.C., Shaffer, A.K., Trites, A.W. & Jarman, S.N. 2013. Quantifying sequence proportions in a DNA-based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: Which counts count? *Mol. Ecol. Resour.* **13**: 620–633.
- Dove, H. & Wayes, R.W. 1996. Plant wax components: A new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. *J. Nutr.* **126**: 13–26.
- Felton, A.M., Felton, A., Foley, W.J. & Lindenmayer, D.B. 2010. The role of timber tree species in the nutritional ecology of spider monkeys in a certified logging concession, Bolivia. *For. Ecol. Manage.* **259**: 1642–1649. Elsevier B.V.
- Ficetola, G.F., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessière, J., *et al.* 2010. An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics* **11**.
- Foley, W.J., McIlwee, A., Lawler, I., Aragones, L., Woolnough, A.P. & Berding, N. 1998. Ecological applications of near infrared reflectance spectroscopy - a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance. *Oecologia* **116**: 293–305.
- Hibert, F., Taberlet, P., Chave, J., Scotti-Saintagne, C., Sabatier, D. & Richard-Hansen, C. 2013. Unveiling the diet of elusive rainforest herbivores in next generation sequencing era? The tapir as a case study. *PLoS One* **8**: e60799.
- Holechek, J.L., Vavra, M. & Pieper, R.D. 1982. Botanical composition determination of range herbivore diets : A review. *J. range Manag.* **35**: 309–315.
- Kaneko, H. & Lawler, I.R. 2006. Can near infrared spectroscopy be used to improve assessment of marine mammal diets via fecal analysis? *Mar. Mammal Sci.* **22**: 261–275.
- Kartzinel, T.R., Chen, P.A., Coverdale, T.C., Erickson, D.L., Kress, W.J., Kuzmina, M.L., *et al.* 2015. DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African large herbivores. **112**.
- Kawabe, M. & Mano, T. 1972. Ecology and behavior of the wild proboscis monkey, *Nasalis larvatus* (Wurmb), in Sabah, Malaysia. *Primates* **13**: 213–227.
- Kern, J.A. 1964. Observations on the habits of the proboscis monkey, *Nasalis larvatus* (Wurmb), made in the Brunei Bay area, Borneo. *Zoologica* **49**: 183–192.
- Matsuda, I., Akiyama, Y., Tuuga, A., Bernard, H. & Clauss, M. 2014. Daily feeding rhythm in proboscis monkeys: A preliminary comparison with other non-human primates. *Primates* **55**: 313–326.

- Matsuda, I., Clauss, M., Tuuga, A., Sugau, J., Hanya, G., Yumoto, T., *et al.* 2017. Factors affecting leaf selection by foregut-fermenting proboscis monkeys: New insight from in vitro digestibility and toughness of leaves. *Sci. Rep.* **7**: 1–10. Nature Publishing Group.
- Matsuda, I., Sha, J.C.M., Ortmann, S., Schwarm, A., Grandl, F., Caton, J., *et al.* 2015. Excretion patterns of solute and different-sized particle passage markers in foregut-fermenting proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) do not indicate an adaptation for rumination. *Physiol. Behav.* **149**: 45–52.
- Matsuda, I., Tuuga, A. & Bernard, H. 2011. Riverine refuging by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) and sympatric primates: Implications for adaptive benefits of the riverine habitat. *Mamm. Biol.* **76**: 165–171.
- Matsuda, I., Tuuga, A., Bernard, H., Sugau, J. & Hanya, G. 2013. Leaf selection by two Bornean colobine monkeys in relation to plant chemistry and abundance. *Sci. Rep.* **3**: 1–6.
- Matsuda, I., Tuuga, A. & Higashi, S. 2009a. Ranging behavior of proboscis monkeys in a riverine forest with special reference to ranging in inland forest. *Int. J. Primatol.* **30**: 313–325.
- Matsuda, I., Tuuga, A. & Higashi, S. 2009b. The feeding ecology and activity budget of proboscis monkeys. *Am. J. Primatol.* **71**: 478–492.
- Meijaard, E., Nijman, V. & Supriatna, J. 2008. *Nasalis larvatus*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Moorhouse-Gann, R.J., Dunn, J.C., de Vere, N., Goder, M., Cole, N., Hipperson, H., *et al.* 2018. New universal ITS2 primers for high-resolution herbivory analyses using DNA metabarcoding in both tropical and temperate zones. *Sci. Rep.* **8**:8542: 1–15.
- Moreno-Black, G. 1978. The use of scat samples in primate diet analysis. *Primates* **19**: 215–221.
- Murai, T. 2006. Mating behaviors of the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Am. J. Primatol.* **68**: 832–837.
- Nijboer, J. 2006. Fibre intake and faeces quality in leaf-eating primates. Universiteit Utrecht.
- Nijboer, J. & Clauss, M. 2006. The digestive physiology of colobine primates. In: *Fibre intake and faeces quality in leaf-eating primates* (J. Nijboer, ed), pp. 9–28. University of Utrecht, The Netherlands.
- Nsubuga, A.M., Robbins, M.M., Roeder, A.D., Morin, P.A., Boesch, C. & Vigilant, L. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Mol. Ecol.* **13**: 2089–2094.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., *et al.* 2017. vegan: community ecology package. R package version 2.4-4.
- Ortmann, S., Bradley, B., Stolter, C. & Ganzhorn, J.U. 2006. Estimating the quality and composition of wild animal diets: a critical survey of methods. In: *Feeding ecology in apes and other primates. Ecological, physical and behavioral aspects* (G. Hohmann, M. M. Robbins, & C. Boesch, eds), pp. 395–418. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Pegard, A., Miquel, C., Valentini, A., Coissac, E., Bouvier, F., François, D., *et al.* 2009. Universal DNA-based methods for assessing the diet of grazing livestock and wildlife from feces. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 5700–5706.
- Peters, G. 2018. userfriendlyscience: Quantitative analysis made accessible. R package version 0.7.1.
- Phipps, C.D. 2014. Investigating the effects of riparian timber extraction on trophic interactions of three Cyprinid species from the the Kalabakan Basin, Northern Borneo using DNA metabarcoding. *MSc Thesis, Imp. Coll. London*.
- Poinar, H.N., Hofreiter, M., Spaulding, W.G., Martin, P.S., Stankiewicz, B.A., Bland, H., *et al.* 1998. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* (80-.). **281**: 402–406.
- Primarck, R.B. 1993. *Essentials of Conservation Biology*, Sinauer As. Sunderland.
- Quéméré, E., Hibert, F., Miquel, C., Lhuillier, E., Rasolondraibe, E., Champeau, J., *et al.* 2013. A DNA metabarcoding study of a primate dietary diversity and plasticity across its entire fragmented range. *PLoS One* **8**.
- R Development Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. R 3.4.3. Vienna, Austria.
- Rayé, G., Miquel, C., Coissac, E., Redjadj, C., Loison, A. & Taberlet, P. 2011. New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: Chamois diet in autumn as a case study. *Ecol. Res.* **26**: 265–276.
- Salter, R.E., MacKenzie, N.A., Nightingale, N., Aken, K.M. & Chai, P. 1985. Habitat use, ranging behaviour, and food habits of the proboscis monkey, *Nasalis larvatus* (van Wurmb), in Sarawak. *Primates* **26**: 436–451.
- Sha, J.C.M., Bernard, H. & Nathan, S. 2008. Status and conservation of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, East Malaysia. *Primate Conserv.* **23**: 107–120.

- Soininen, E.M., Valentini, A., Coissac, E., Miquel, C., Gielly, L., Brochmann, C., *et al.* 2009. Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures. *Front. Zool.* **9**: 1–9.
- Srivathsan, A., Ang, A., Vogler, A.P. & Meier, R. 2016. Fecal metagenomics for the simultaneous assessment of diet, parasites, and population genetics of an understudied primate. *Front. Zool.* 1–13. *Frontiers in Zoology*.
- Srivathsan, A., Sha, J.C.M., Vogler, A.P. & Meier, R. 2014. Comparing the effectiveness of metagenomics and metabarcoding for diet analysis of a leaf-feeding monkey (*Pygathrix nemaeus*). *Mol. Ecol. Resour.* **15**: 250–261.
- Stark, D.J. 2018. Habitat use and movement of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in a degraded and human-modified forest landscape. PhD Thesis, Cardiff University.
- Stark, D.J., Vaughan, I.P., Saldivar, D.A.R., Nathan, S.K.S.S. & Goossens, B. 2017. Evaluating methods for estimating home ranges using GPS collars: A comparison using proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*). *PLoS One* **12**: 1–23.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C. & Willerslev, E. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* **21**: 2045–2050.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., *et al.* 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* **35**.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **17**: 1105–1109.
- Thiry, V., Bhasin, O., Stark, D.J., Beudels-Jamar, R.C., Vercauteren Drubbel, R., Nathan, S.K.S.S., *et al.* 2019. Seed dispersal by proboscis monkeys: the case of *Nauclea* spp. *Primates* **60**: 449–457. Springer Japan.
- Thiry, V., Stark, D.J., Goossens, B., Slachmuylder, J.-L., Vercauteren Drubbel, R. & Vercauteren, M. 2016. Use and selection of sleeping sites by proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*, along the Kinabatangan River, Sabah, Malaysia. *Folia Primatol.* **87**: 180–196.
- Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M.A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., *et al.* 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: The trnL approach. *Mol. Ecol. Resour.* **9**: 51–60.
- Waterman, P.G. & Kool, K.M. 1994. Colobine food selection and plant chemistry. In: *Colobine Monkeys: Their Ecology, Behaviour, and Evolution* (A. G. Davies & J. F. Oates, eds), pp. 251–284. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Woods, A. 1995. Observations on dietary habits of proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*, at Danau Sentarum Wildlife Reserve, Kalimantan Barat, Republic of Indonesia.
- Yeager, C.P. 1989. Feeding ecology of the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Int. J. Primatol.* **10**: 497–530.

Appendices

Figure 1S. Accumulation curve of plant species found in 25 botanical plots in Lot 6 of the LKWS

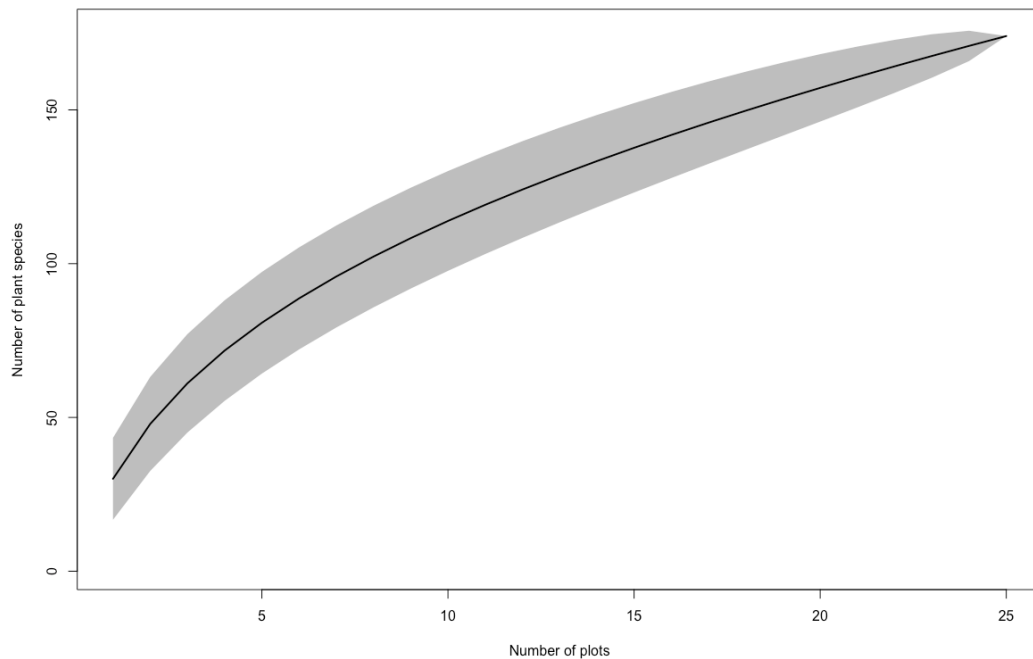


Table 1S. List of plant taxa (n=67) consumed by proboscis monkeys at the riverside (recorded by scan and *ad libitum* sampling observation methods, from May 2015 to March 2017)

Family	Species	Observation method sampling (n)
Anacardiaceae	<i>Buchanania arborescens</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Dracontomelon dao</i>	Scan (16)
Annonaceae	<i>Cananga odorata</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Polyalthia obliqua</i>	<i>Ad libitum</i>
Apocynaceae	<i>Alstonia sp.</i>	Scan (1)
	<i>Alstonia iwahigensis</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Rauvolfia sumatrana</i>	<i>Ad libitum</i>
Araceae	<i>Pothos brevistylus</i>	<i>Ad libitum</i>
Clusiaceae	<i>Garcinia parvifolia</i>	Scan (6)
Compositae	<i>Mikania cordata</i>	Scan (9)
Connaraceae	<i>Agelaea borneensis</i>	<i>Ad libitum</i>
Cucurbitaceae	<i>Trichosanthes quinqualata</i>	<i>Ad libitum</i>
Dilleniaceae	<i>Dillenia borneensis</i>	Scan (1)
	<i>Dillenia excelsa</i>	Scan (10)
	<i>Tetracera scandens</i>	<i>Ad libitum</i>
Dipterocarpaceae	<i>Vatica venulosa</i>	Scan (4)
Ebenaceae	<i>Diospyros sp.</i>	Scan (2)
	<i>Diospyros sp.1</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Diospyros tuberculata</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Diospyros walichii</i>	<i>Ad libitum</i>
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum cuneatum</i>	<i>Ad libitum</i>
Euphorbiaceae	<i>Mallotus floribundus</i>	Scan (6)

	<i>Mallotus muticus</i>	Scan (28)
Lamiaceae	<i>Vitex pinnata</i>	Scan (39)
Lauraceae	<i>Actinodaphne glomerata</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Dehaasia</i> sp.	Scan (3)
	<i>Litsea accedens</i>	Scan (1)
Lecythidaceae	<i>Planchonia valida</i>	Scan (1)
Leguminosae	<i>Caesalpinia</i> sp.1	Scan (2)
	<i>Cynometra ramiflora</i>	Scan (5)
	<i>Cynometra</i> sp.	<i>Ad libitum</i>
	<i>Dalbergia stipulaceae</i>	Scan (1)
	<i>Parkia</i> cf. <i>javanica</i>	<i>Ad libitum</i>
Lophopyxidaceae	<i>Lophopyxis maingayi</i>	Scan (4)
Lythraceae	<i>Duabanga moluccana</i>	Scan (1)
	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	<i>Ad libitum</i>
Malvaceae	<i>Colona serratifolia</i>	Scan (20)
	<i>Kleinhovia hospita</i>	Scan (5)
	<i>Pterospermum diversifolium</i>	Scan (3)
	<i>Pterospermum elongatum</i>	Scan (104)
	<i>Pterospermum</i> sp.	<i>Ad libitum</i>
Moraceae	<i>Ficus benamina</i>	Scan (1)
	<i>Ficus crassiramea</i>	Scan (11)
	<i>Ficus fistulosa</i>	Scan (4)
	<i>Ficus racemosa</i>	Scan (848)
	<i>Ficus</i> sp.1	Scan (1)
Myrtaceae	<i>Syzygium</i> cf. <i>brachypodum</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Syzygium fastigiatum</i>	<i>Ad libitum</i>
Passifloraceae	<i>Passiflora foetida</i>	Scan (4)
Phyllanthaceae	<i>Antidesma thwaitesianum</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Bridelia penangiana</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Bridelia stipularis</i>	Scan (2)
	<i>Cleistanthus oblongifolius</i>	<i>Ad libitum</i>
	<i>Cleistanthus</i> sp.	Scan (15)
	<i>Glochidion</i> sp.	<i>Ad libitum</i>
Putranjivaceae	<i>Drypetes</i> sp.	Scan (9)
Rhamnaceae	<i>Zizyphus borneensis</i>	<i>Ad libitum</i>
Rubiaceae	<i>Ludokia borneensis</i>	Scan (30)
	<i>Mitragyna speciosa</i>	Scan (6)
	<i>Nauclea orientalis</i>	Scan (178)
	<i>Nauclea subdita</i>	Scan (2)
Tetramelaceae	<i>Octomeles sumatrana</i>	Scan (195)
Unknown	Unknown spp.	Scan (60)
	Unknown sp.1	Scan (5)
	Unknown sp.2	Scan (12)
Urticaceae	<i>Poikilospermum suaveolens</i>	Scan (1)
Vitaceae	<i>Cayratia trifolia</i>	Scan (11)
	<i>Leea indica</i>	Scan (1)

ⁱ Where numbers in brackets refer to the number of feeding occurrences recorded during scan sampling; the top-five consumed plants are in bold. Unknown spp. includes several undistinguishable plants, different from Unknown sp. 1 and 2., and is not taken into account in the 67 food plant taxa.

Table 2S. List of food plant taxa (n=100) recorded in proboscis monkey faeces using DNA metabarcoding

Family	MOTU	Nb of faeces	F ₀	Rank	Count of reads
Anacardiaceae	<i>Dracontomelon dao</i>	109	0.70	5	219027
	Anacardiaceae 1	19	0.12	46	19614
	Anacardiaceae 2	5	0.03	80	2293
Annonaceae	<i>Polyalthia</i> 1	68	0.44	14	81578
	Annonaceae 1	2	0.01	86	1360
Apocynaceae	Apocynaceae 1	55	0.35	17	47099
	Apocynaceae 2	6	0.04	76	13766
Araceae	<i>Pothos brevistylus</i>	30	0.19	32	5714
Burseraceae	<i>Canarium denticulatum</i>	38	0.25	27	49628
Calophyllaceae	<i>Mesua oblongifolia</i>	14	0.09	66	18848
Capparaceae	<i>Crateva religiosa</i>	1	0.01	96	1243
Chrysobalanaceae	Chrysobalanaceae 1	20	0.13	42	6107
Compositae	<i>Mikania cordata</i>	38	0.25	28	5999
Convolvulaceae	<i>Erycibe grandifolia</i>	55	0.35	18	7093
	<i>Merremia umbellata</i>	23	0.15	40	37394
Cornaceae	<i>Alangium javanicum</i>	15	0.10	63	10292
Dilleniaceae	<i>Dillenia</i> 1	73	0.47	12	46686
Dipterocarpaceae	<i>Vatica</i> 1	30	0.19	33	89704
Ebenaceae	<i>Diospyros</i> 1	20	0.13	43	12314
Elaeocarpaceae	<i>Elaeocarpus</i> 1	34	0.22	30	13632
	Elaeocarpaceae 1	15	0.10	64	8386
Euphorbiaceae	<i>Mallotus</i> 1	117	0.75	4	398420
	Euphorbiaceae 1	47	0.30	21	61929
	<i>Mallotus floribundus</i>	43	0.28	23	19334
	Euphorbiaceae 2	33	0.21	31	6928
	Euphorbiaceae 3	18	0.12	50	60332
	<i>Hancea</i> 1	2	0.01	87	3269
	<i>Mallotus</i> 2	1	0.01	97	782
Hypericaceae	<i>Cratoxylum</i> 1	6	0.04	77	3508
Lamiaceae	<i>Vitex</i> 1	74	0.48	11	268104
	<i>Teijsmanniodendron bogoriense</i>	16	0.10	57	14216
Lauraceae	Lauraceae 1	49	0.32	20	25642
	<i>Cryptocarya ferrea</i>	39	0.25	26	18026
Lauraceae	Lauraceae 3	6	0.04	78	14782
Lecythidaceae	<i>Barringtonia pterita</i>	19	0.12	47	4396
	<i>Planchonia valida</i>	9	0.06	72	9164
Leguminosae	Leguminosae 1	75	0.48	10	129914
	Caesalpinia sp.1	64	0.41	15	46196
	<i>Derris elegans</i>	61	0.39	16	42456
	<i>Entada rheedii</i>	53	0.34	19	39678
	Leguminosae 2	29	0.19	35	9073
	Leguminosae 3	24	0.15	39	25776
	Leguminosae 4	18	0.12	51	2268
	<i>Dalbergia stipulacea</i>	17	0.11	53	17210
	Leguminosae 8	16	0.10	58	87567
	Leguminosae 6	16	0.10	59	4148
	Leguminosae 7	16	0.10	60	2699
	Leguminosae 5	16	0.10	61	1843
	Leguminosae 10	11	0.07	70	5822
	Leguminosae 16	2	0.01	88	5241

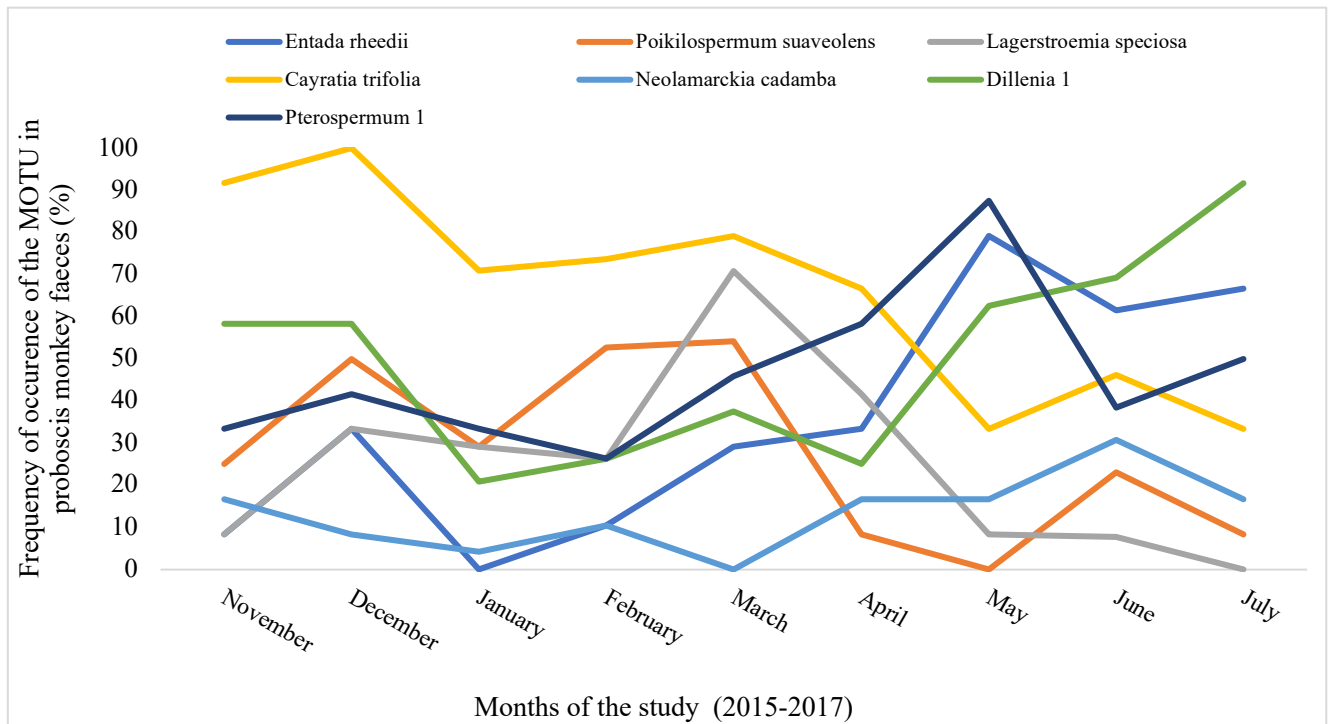
Lophopyxidaceae	<i>Lophopyxis maingayi</i>	88	0.57	8	620673
	Lophopyxidaceae 4	4	0.03	84	3817
Lythraceae	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	42	0.27	24	40077
	Lythraceae 1	5	0.03	81	9348
	<i>Duabanga moluccana</i>	2	0.01	89	30164
Malpighiaceae	Malpighiaceae 1	36	0.23	29	32783
Malvaceae	<i>Pterospermum</i> 1	72	0.46	13	63054
	<i>Microcos crassifolia</i>	29	0.19	36	3955
	<i>Kleinhovia hospita</i>	2	0.01	90	9557
Moraceae	<i>Ficus</i> 1	149	0.96	2	528965
	Moraceae 1	29	0.19	37	13344
	Moraceae 2	18	0.12	52	1172
	Moraceae 3	8	0.05	73	14408
	Moraceae 4	7	0.05	75	5211
	Moraceae 5	5	0.03	82	9179
	Moraceae 8	1	0.01	98	345
Myristicaceae	Myristicaceae 2	2	0.01	91	1778
Myrtaceae	<i>Syzygium</i> 1	89	0.57	7	114577
	<i>Syzygium</i> 2	30	0.19	34	70160
	Myrtaceae 1	17	0.11	54	1414
	Myrtaceae 7	1	0.01	99	809
Phyllanthaceae	<i>Bridelia</i> 1	154	0.99	1	1992087
	Phyllanthaceae 1	27	0.17	38	1538
	<i>Margaritaria indica</i>	20	0.13	44	30022
	Phyllanthaceae 2	17	0.11	55	25600
	Phyllanthaceae 3	15	0.10	65	661
	<i>Bridelia</i> 2	13	0.08	67	41442
	Phyllanthaceae 4	12	0.08	68	3654
	Phyllanthaceae 8	6	0.04	79	11404
	Phyllanthaceae 12	3	0.02	85	2123
Polygalaceae	<i>Xanthophyllum</i> 1	21	0.14	41	2727
Rhamnaceae	<i>Ziziphus borneensis</i>	19	0.12	48	2084
Rubiaceae	Rubiaceae 1	88	0.57	9	573173
	<i>Neolamarckia cadamba</i>	20	0.13	45	130023
	Rubiaceae 2	16	0.10	62	1022
	Rubiaceae 6	5	0.03	83	10189
	Rubiaceae 13	2	0.01	92	4736
	<i>Antirhea inaequalis</i>	2	0.01	93	343
	<i>Uncaria</i> 1	1	0.01	100	4416
Salicaceae	Salicaceae 1	17	0.11	56	7745
Sapindaceae	<i>Dimocarpus longan</i>	19	0.12	49	32272
	Sapindaceae 1	10	0.06	71	6051
	Sapindaceae 2	2	0.01	94	3327
	<i>Dimocarpus</i> sp.1	2	0.01	95	451
Simaroubaceae	Simaroubaceae 1	8	0.05	74	12420
Symplocaceae	Symplocaceae 1	12	0.08	69	8854
Tetramelaceae	<i>Octomeles sumatrana</i>	122	0.79	3	649925
Urticaceae	<i>Poikilospermum suaveolens</i>	45	0.29	22	9437
Vitaceae	<i>Cayratia trifolia</i>	100	0.65	6	46868
	<i>Tetrastigma lanceolarium</i>	41	0.26	25	13121

ⁱ Where rank numbers refer to the Fo score (i.e., Frequency of occurrences = the proportion of faecal samples containing the MOTU), and MOTUs with the top-five Fo score in bold.

Table 3S. List of food plant families (n=39) recorded in proboscis monkey faeces

Family	MOTUs	Count reads	Nb fèces	F_o
Phyllanthaceae	9	2108531	154	0.99
Moraceae	7	572624	149	0.96
Leguminosae	14	419891	137	0.88
Euphorbiaceae	7	550994	128	0.83
Tetramelaceae	1	649925	122	0.79
Anacardiaceae	3	240934	115	0.74
Vitaceae	2	59989	114	0.74
Myrtaceae	4	186960	100	0.65
Rubiaceae	7	723902	94	0.61
Lophopyxidaceae	2	624490	92	0.59
Malvaceae	3	76566	88	0.57
Lamiaceae	2	282320	79	0.51
Dilleniaceae	1	46686	73	0.47
Lauraceae	3	58450	73	0.47
Convolvulaceae	2	44487	72	0.46
Annonaceae	2	82938	69	0.45
Apocynaceae	2	60865	55	0.35
Lythraceae	3	79589	49	0.32
Urticaceae	1	9437	45	0.29
Elaeocarpaceae	2	22018	43	0.28
Burseraceae	1	49628	38	0.25
Compositae	1	5999	38	0.25
Malpighiaceae	1	32783	36	0.23
Araceae	1	5714	30	0.19
Dipterocarpaceae	1	89704	30	0.19
Sapindaceae	4	42101	28	0.18
Lecythidaceae	2	13560	24	0.15
Polygalaceae	1	2727	21	0.14
Chrysobalanaceae	1	6107	20	0.13
Ebenaceae	1	12314	20	0.13
Rhamnaceae	1	2084	19	0.12
Salicaceae	1	7745	17	0.11
Cornaceae	1	10292	15	0.10
Calophyllaceae	1	18848	14	0.09
Symplocaceae	1	8854	12	0.08
Simaroubaceae	1	12420	8	0.05
Hypericaceae	1	3508	6	0.04
Myristicaceae	1	1778	2	0.01
Capparaceae	1	1243	1	0.01

ⁱ Where plant families are ranked by their frequency of occurrences (Fo)

Figure 2S. Monthly variation in the frequencies of occurrences of seven MOTUs detected in proboscis monkey faeces**Table 4S.** List of the plant taxa (n=89) consumed by proboscis monkeys in the study site, combining both methods

Family	Genus	Taxa	DNA	DO
Anacardiaceae	<i>Buchanania</i>	<i>Buchanania arborescens</i>		1
	<i>Dracontomelon</i>	<i>Dracontomelon dao</i>	1	1
Annonaceae	<i>Cananga</i>	<i>Cananga odorata</i>		1
	<i>Polyalthia</i>	<i>Polyalthia obliqua</i>		1
Apocynaceae	<i>Alstonia</i>	<i>Alstonia iwahigensis</i>		1
	<i>Rauvolfia</i>	<i>Rauvolfia sumatrana</i>		1
Araceae	<i>Pothos</i>	<i>Pothos brevistylus</i>	1	1
Burseraceae	<i>Canarium</i>	<i>Canarium denticulatum</i>	1	
Calophyllaceae	<i>Mesua</i>	<i>Mesua oblongifolia</i>	1	
Capparaceae	<i>Crateva</i>	<i>Crateva religiosa</i>	1	
Chrysobalanaceae	Unknown 1	Unknown 1	1	
Clusiaceae	<i>Garcinia</i>	<i>Garcinia parvifolia</i>		1
Compositae	<i>Mikania</i>	<i>Mikania cordata</i>	1	1
Connaraceae	<i>Agelaea</i>	<i>Agelaea borneensis</i>		1
Convolvulaceae	<i>Erycibe</i>	<i>Erycibe grandifolia</i>	1	
	<i>Merremia</i>	<i>Merremia umbellata</i>	1	
Cornaceae	<i>Alangium</i>	<i>Alangium javanicum</i>	1	
Cucurbitaceae	<i>Trichosanthes</i>	<i>Trichosanthes quinqualata</i>		1
Dilleniaceae	<i>Dillenia</i>	<i>Dillenia borneensis</i>		1
	<i>Dillenia</i>	<i>Dillenia excelsa</i>		1
	<i>Tetracera</i>	<i>Tetracera scandens</i>		1
Dipterocarpaceae	<i>Vatica</i>	<i>Vatica venulosa</i>		1

Ebenaceae	<i>Diospyros</i>	<i>Diospyros sp.1</i>	1
	<i>Diospyros</i>	<i>Diospyros tuberculata</i>	1
	<i>Diospyros</i>	<i>Diospyros walichii</i>	1
Elaeocarpaceae	<i>Elaeocarpus</i>	<i>Elaeocarpus 1</i>	1
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i>	<i>Erythroxylum cuneatum</i>	1
Euphorbiaceae	<i>Hancea</i>	<i>Hancea 1</i>	1
	<i>Mallotus</i>	<i>Mallotus floribundus</i>	1
	<i>Mallotus</i>	<i>Mallotus muticus</i>	1
Hypericaceae	<i>Cratoxylum</i>	<i>Cratoxylum 1</i>	1
Lamiaceae	<i>Teijsmanniodendron</i>	<i>Teijsmanniodendron bogoriense</i>	1
	<i>Vitex</i>	<i>Vitex pinnata</i>	1
Lauraceae	<i>Actinodaphne</i>	<i>Actinodaphne glomerata</i>	1
	<i>Cryptocarya</i>	<i>Cryptocarya ferrea</i>	1
	<i>Dehaasia</i>	<i>Dehaasia sp.</i>	1
	<i>Litsea</i>	<i>Litsea accedens</i>	1
Lecythidaceae	<i>Barringtonia</i>	<i>Barringtonia pterita</i>	1
	<i>Planchonia</i>	<i>Planchonia valida</i>	1
Leguminosae	<i>Caesalpinia</i>	<i>Caesalpinia sp.1</i>	1
	<i>Cynometra</i>	<i>Cynometra ramiflora</i>	1
	<i>Dalbergia</i>	<i>Dalbergia stipulaceae</i>	1
	<i>Derris</i>	<i>Derris elegans</i>	1
	<i>Entada</i>	<i>Entada rheedii</i>	1
	<i>Parkia</i>	<i>Parkia cf. javanica</i>	1
Lophopyxidaceae	<i>Lophopyxis</i>	<i>Lophopyxis maingayi</i>	1
Lythraceae	<i>Duabanga</i>	<i>Duabanga moluccana</i>	1
	<i>Lagerstroemia</i>	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	1
Malpighiaceae	Unknown 2	Unknown 2	1
Malvaceae	<i>Colona</i>	<i>Colona serratifolia</i>	1
	<i>Kleinhovia</i>	<i>Kleinhovia hospita</i>	1
	<i>Microcos</i>	<i>Microcos crassifolia</i>	1
	<i>Pterospermum</i>	<i>Pterospermum diversifolium</i>	1
	<i>Pterospermum</i>	<i>Pterospermum elongatum</i>	1
Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>Ficus benjamina</i>	1
	<i>Ficus</i>	<i>Ficus crassiramea</i>	1
	<i>Ficus</i>	<i>Ficus fistulosa</i>	1
	<i>Ficus</i>	<i>Ficus racemosa</i>	1
	<i>Ficus</i>	<i>Ficus sp.1</i>	1
Myristicaceae	Unknown 3	Unknown 3	1
Myrtaceae	<i>Syzygium</i>	<i>Syzygium cf. brachypodum</i>	1
	<i>Syzygium</i>	<i>Syzygium fastigiatum</i>	1
Passifloraceae	<i>Passiflora</i>	<i>Passiflora foetida</i>	1
Phyllanthaceae	<i>Antidesma</i>	<i>Antidesma thwaitesianum</i>	1
	<i>Bridelia</i>	<i>Bridelia penangiana</i>	1
	<i>Bridelia</i>	<i>Bridelia stipularis</i>	1
	<i>Cleistanthus</i>	<i>Cleistanthus oblongifolius</i>	1
	<i>Glochidion</i>	<i>Glochidion sp.</i>	1
	<i>Margaritaria</i>	<i>Margaritaria indica</i>	1
	<i>Xanthophyllum</i>	<i>Xanthophyllum 1</i>	1
Polygalaceae			
Putranjivaceae	<i>Drypetes</i>	<i>Drypetes sp.</i>	1

Rhamnaceae	<i>Zizyphius</i>	<i>Zizyphius borneensis</i>	1	1
Rubiaceae	<i>Antirhea</i>	<i>Antirhea inaequalis</i>	1	
	<i>Ludkia</i>	<i>Ludkia borneensis</i>		1
	<i>Mitragyna</i>	<i>Mitragyna speciosa</i>		1
	<i>Nauclea</i>	<i>Nauclea orientalis</i>		1
	<i>Nauclea</i>	<i>Nauclea subdita</i>		1
	<i>Neolamarckia</i>	<i>Neolamarckia cadamba</i>	1	
	<i>Uncaria</i>	<i>Uncaria 1</i>	1	
Salicaceae	Unknown 4	Unknown 4	1	
Sapindaceae	<i>Dimocarpus</i>	<i>Dimocarpus longan</i>	1	
	<i>Dimocarpus</i>	<i>Dimocarpus sp.1</i>	1	
Simaroubaceae	Unknown 5	Unknown 5	1	
Symplocaceae	Unknown 6	Unknown 6	1	
Tetramelaceae	<i>Octomeles</i>	<i>Octomeles sumatrana</i>	1	1
Urticaceae	<i>Poikilospermum</i>	<i>Poikilospermum suaveolens</i>	1	1
Vitaceae	<i>Cayratia</i>	<i>Cayratia trifolia</i>	1	1
	<i>Leea</i>	<i>Leea indica</i>		1
	<i>Tetrastigma</i>	<i>Tetrastigma lanceolarium</i>	1	

ⁱ Where “DNA” refers to DNA metabarcoding method, “DO” to direct behavioural observation method, and “1” indicates that the taxa was detected by a method.

4 Variations saisonnières de la taille des particules fécales chez *Nasalis larvatus*



Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence les espèces de plantes consommées par les nasiques dans le *LKWS*. Nous avons également observé des variations alimentaires en fonction des saisons. Ici, nous nous intéressons de plus près à ces variations saisonnières. Pour ce faire, nous utilisons une machine à tamis animée permettant de calculer la taille des particules fécales (MPS), mesure généralement utilisée pour estimer l'efficacité de mastication chez les mammifères herbivores. Nous confirmons que les nasiques présentent une taille de particules fécale (MPS) très faible, c'est-à-dire une bonne efficacité de mastication. Finalement, nous démontrons que les MPS chez *Nasalis larvatus* varient selon les saisons, certainement en réponse à un changement d'alimentation.

Ce chapitre correspond à une *short communication* publiée :

Thiry V, Clauss M, Stark D.J., Beudels-Jamar R.C., Vercauteren Drubbel R., Nathan S.K.S.S., Goossens B. and Vercauteren M. (2018) Faecal particle size in free-ranging proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*: variation among seasons. *Folia Primatologica*, 89: 327-334. DOI: 10.1159/000490794

Faecal particle size in free-ranging proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*: Variation between seasons

Authors:

Valentine Thiry^{ab*}, Marcus Clauss^c, Danica J. Stark^{de}, Roseline C. Beudels-Jamar^b, Régine Vercauteren Drubbel^a, Senthilvel K. S. S. Nathan^f, Benoît Goossens^{defg}, Martine Vercauteren^a

^a Anthropology and Human Genetics Unit, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

^b Conservation Biology Unit, Education and Nature, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels, Belgium;

^c Clinic for Zoo Animals, Exotic Pets and Wildlife, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich, Switzerland;

^d Organisms and Environment Division, Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff CF10 3AX, United Kingdom;

^e Danau Girang Field Centre c/o Sabah Wildlife Department, Wisma Muis, Kota Kinabalu, Sabah 88100, Malaysia;

^f Sabah Wildlife Department, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia;

^g Sustainable Places Research Institute, Cardiff University, 33 Park Place, Cardiff CF10 3BA, UK

*** Corresponding author**

Valentine Thiry: valentinethiry89@gmail.com

4.1 Abstract

Reducing the size of food particles is crucial for herbivores. Seasonal dietary changes are known to influence animals' chewing efficiency. Proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) are foregut fermenters, with a high chewing efficiency allowing them to achieve very fine faecal particles. In this study, we investigated how proboscis monkeys' chewing efficiency varies among wet and dry seasons, hypothesising differences possibly related to diet change. Faecal particle size analysis is an established approach to estimate chewing efficiency in mammalian herbivores. We analysed 113 proboscis monkey faecal samples collected in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary, between 2015 and 2017. By following standard sieve analysis protocols, we measured a mean particle size $MPS_{(0.025-8)}$ of 0.45 ± 0.14 mm, and confirmed a previous result that proboscis monkeys have a very low faecal MPS. This study highlights a seasonal influence on proboscis monkeys' chewing efficiency, with smaller MPS (better chewing efficiency) during the wet season. During that time of the year, individuals may potentially change their diet, as all faecal samples contained intact seeds. Whether the seasonal MPS difference in proboscis monkeys is smaller than in other colobines due to their 'rumination' strategy remains to be investigated.

Keywords

Nasalis larvatus, chewing efficiency, nutritional ecology, forestomach, diet change, foregut fermenter

4.2 Introduction

Reducing the size of food particles is crucial in herbivores that rely on gut microbiota to digest plant components. In herbivores, fibre digestion relies on digesta retention and particle size. To accomplish the same digestibility, large digesta particles will need longer retention times than smaller ones (Bjorndal *et al.*, 1990). Measuring faecal particle size by wet sieving analysis, is an established non-invasive approach to determine the chewing efficiency of mammals (Fritz *et al.*, 2009). Several studies focused on faecal particle size in mammals (Fritz *et al.*, 2009; Clauss *et al.*, 2015), or more specifically in ruminants (Renecker & Hudson, 1990; Clauss *et al.*, 2002) and primates (Dunbar & Bose, 1991; Matsuda *et al.*, 2014b; Venkataraman *et al.*, 2014; Weary *et al.*, 2017). Across mammals, the size of faecal particles usually increases with animal body mass (Fritz *et al.*, 2009). However, among primates, the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) displays a particularly small mean particle size (MPS) for its average body mass (15 kg) (Matsuda *et al.*, 2014b). Proboscis monkeys are foregut fermenters (Matsuda *et al.*, 2014b). Like other colobine primates, they have a sacculated forestomach where the food is fermented (Bauchop & Martucci, 1968; Milton, 1993). Regurgitation and remastication (i.e. rumination) has been observed in wild proboscis monkeys (Matsuda *et al.*, 2011a). Whether this facultative rumination strategy explains how proboscis monkeys achieve particularly fine faecal particles remains unclear (Matsuda *et al.*, 2014b).

Seasonal dietary change and dental wear are known to influence animals' chewing efficiency (Venkataraman *et al.*, 2014). Within a species, faecal particle size can vary in relation to diet (Renecker & Hudson, 1990) or seasons (Nygren & Hofmann, 1990). For instance, in gelada baboons (*Theropithecus gelada*), chewing efficiency decreases during the dry season when individuals feed on tougher non-preferred food items, with a more distinct effect in older individuals (Venkataraman *et al.*, 2014). The opposite is observed in frugivorous chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*): MPS is higher when chimpanzees feed on drupe fruits (preferred foods) than on figs (non-preferred foods) (Weary *et al.*, 2017). The authors suggested that chewing efficiency might be less critical in frugivores than in typical folivores, because they did not observe an effect of age on MPS.

With their natural diet, proboscis monkeys are excellent candidates to investigate how MPS might change throughout the year. While proboscis monkeys were first considered essentially folivores, it is now recognised that they preferentially feed on unripe fruits/seeds when they are available (Matsuda *et al.*, 2009b). The present study investigates how proboscis monkeys' chewing efficiency varies among wet and dry seasons. We hypothesised that proboscis monkeys will achieve a higher chewing efficiency (MPS will decrease) during the season when individuals are able to consume their preferred food.

Moreover, we investigated some methodological aspects of sieve analysis. Extending the sieve column (adding larger top or smaller bottom sieves) is known to influence MPS measurements (Fritz *et al.*, 2012), as well as including the weight of unchewed items (i.e. large seeds) and maximum particle

length (MPL) in the MPS calculation (Weary *et al.*, 2017). Therefore, we combined various sets of sieves, with or without the MPL, and assessed the impact on MPS measurements.

4.3 Material and Methods

4.3.1 Study site

Our study took place in the Lower Kinabatangan Floodplain (5°20'-05°45'N, 117°40'-118°30'E), in Eastern Sabah (Malaysian Borneo), between 2015 and 2017. Daily temperatures and rainfall were measured at the research station. Below we will refer to dry season (May-June-July) where the mean monthly rainfall is 120 ($\pm$ SD=100) mm and to the wet season (November-February) where it reaches 243 ($\pm$ SD=104) mm. Mean minimum and maximum temperatures reached 24.4 ($\pm$ SD=0.6) and 30 ($\pm$ SD=1.7) °C, respectively.

4.3.2 Faecal sampling

In riverine forests, proboscis monkeys are known to take refuge along riverbanks to spend the night (Matsuda *et al.*, 2011b). During this study, we conducted boat-based surveys along the Kinabatangan River, in the late afternoon, to find proboscis monkey groups settled at their sleeping sites. To avoid sampling the same group multiple times, we searched for proboscis monkey groups in different parts (North and South riverbanks) along a pre-established 21 km transect in a month. In the morning, we travelled back to the group's location of the previous evening. Once the group left the riverside to forage further inland, we moved to the riverbank to search for fresh faecal samples that had fallen under sleeping trees. We collected large samples, presumed to belong to adult individuals (undistinguished sex). Between May and July 2015, January and February 2016, and November 2016 and February 2017, two faecal samples were collected per group and placed in separate tubes, to perform two different analyses: manual and wet sieving analyses. 137 samples (15 ± 5 samples/month) were analysed by the manual method and 113 faecal samples (13 ± 6 samples/month) by wet sieving method.

4.3.3 Manual analyses

Faecal samples were cleaned with water in a 0.4 mm mesh strainer to discard faecal matter. The remaining digested items were searched for intact seeds. Percentages of samples containing seeds were used to assess seasonal changes.

4.3.4 Wet sieving analyses

Faecal samples were stored in a tube with 70% ethanol (Matsuda *et al.*, 2014b). They were analysed using the standard wet sieving method (Fritz *et al.*, 2012). Before sieving, each sample was

suspended in a beaker filled with water that was stirred continuously for 12 hours. The sample was then poured over a series of 10 sieves with mesh size of 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.63, 0.04 and 0.025 mm (Retsch AS 200 digit, Haan, Germany). We conducted the sieving analysis for 10 minutes with an amplitude of 2 mm and a water flow of approximately 2 l/min. If a particle was retained on the largest sieve, its size was recorded as the maximum particle size. Particles retained on each sieve were transferred onto pre-weighed petri dishes and dried at 103°C overnight. After cooling in a desiccator, petri dishes were weighed with an analysis balance with measuring accuracy of 1 mg (Kern AEJ 220-4M, Kern, Balingen, Germany). When large seeds (≥ 2 mm) were retained intact in sieves, they were removed, weighed and subtracted from the respective sieve weight. However, the smaller (< 2 mm) and numerous seeds, such as *Ficus* and *Nauclea* seeds, were logistically impossible to remove from the analysis (Weary *et al.*, 2017).

Among various indices, the discrete mean has been proposed as a standard to describe the MPS value obtained from sieving analyses (Fritz *et al.*, 2012). To compare our results with a previous study conducted on proboscis monkey's faecal particle sizes (Matsuda *et al.*, 2014b), we excluded the two smallest sieves (mesh sizes: 0.040 and 0.025 mm) from the MPS calculation, as they were not used by Matsuda *et al.*, (2014b). Although the latter study used a larger top sieve (16 mm) than we did, no particles were ever retained on it.

4.3.5 Statistical analyses

We carried out t-tests on log-transformed data to compare MPS(0.025-8mm) values between dry and wet seasons. We compared MPS values calculated for 28 faecal samples, with or without considering the length of the maximum particles and using series of 10 (0.025-8 mm) or 8 (0.063-8 mm) sieves. To assess the difference between those four MPS measurements, we performed a related-samples Wilcoxon signed rank test between all pairs of MPS values, using the Bonferroni adjustment (for multiple comparisons). R 3.4.0 (R Development Core Team, 2017) was used for all statistical analyses, with statistical significance of $p < 0.05$.

4.4 Results

4.4.1 Manual analyses

By cleaning fresh faeces (N=137), we observed that the percentage of faecal samples containing intact seeds changed throughout the year (Figure 39), with a mean of 100 ± 0 % during the wet season (November-February) and of 38 ± 10 % during the dry season (May-July).

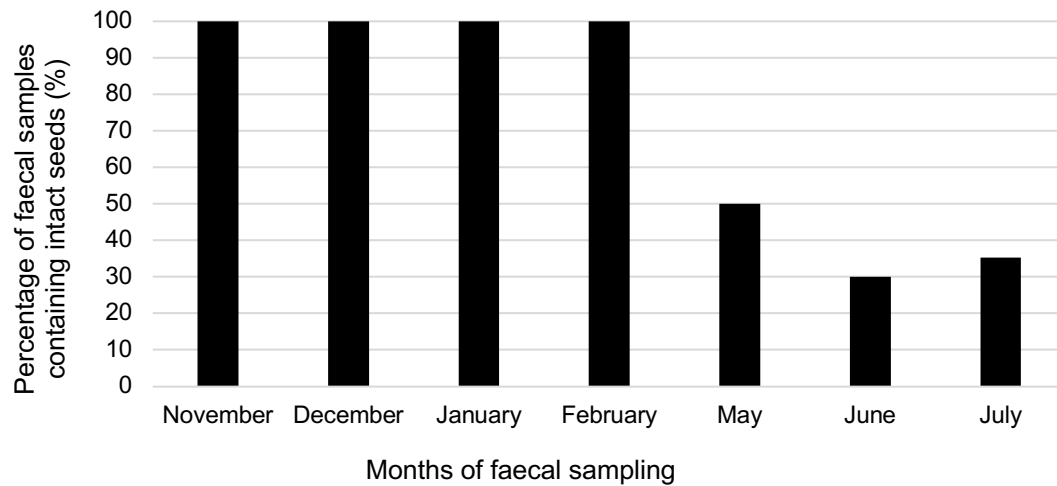


Figure 39. Percentage of faecal samples of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) collected during different months that contain intact seeds

4.4.2 Wet sieving analyses

Figure 40 illustrates the typical way faecal particles are distributed after wet sieving analysis.

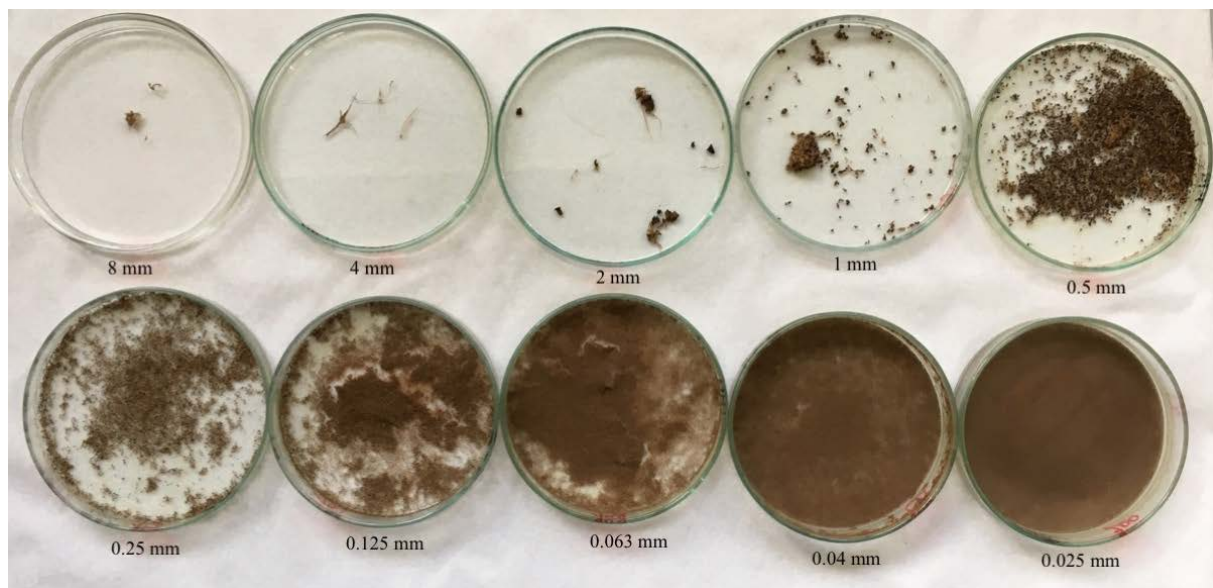


Figure 40. Distribution of proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) faecal particles after wet sieving analysis. Each petri dish represents one of the 10 cascade sieves, ordered from 8 mm until 0.025 mm mesh size. The sample PMF217-1 collected on the 28th of January 2017 was used for this example.

By using a cascade of 10 sieves (mesh sizes: 8 to 0.025 mm), the MPS reaches an average of 0.45 ± 0.14 mm and increases over the course of the observation period from November to July (Figure 41). By using a series of eight sieves (mesh sizes: 8 to 0.063 mm) like in Matsuda et al. (2014), we

observe that $MPS_{(0.063-8mm)}$ is significantly larger than $MPS_{(0.025-8mm)}$, reaching 0.55 ± 0.14 mm ($V=6441$, $N=113$, $p<0.001$).

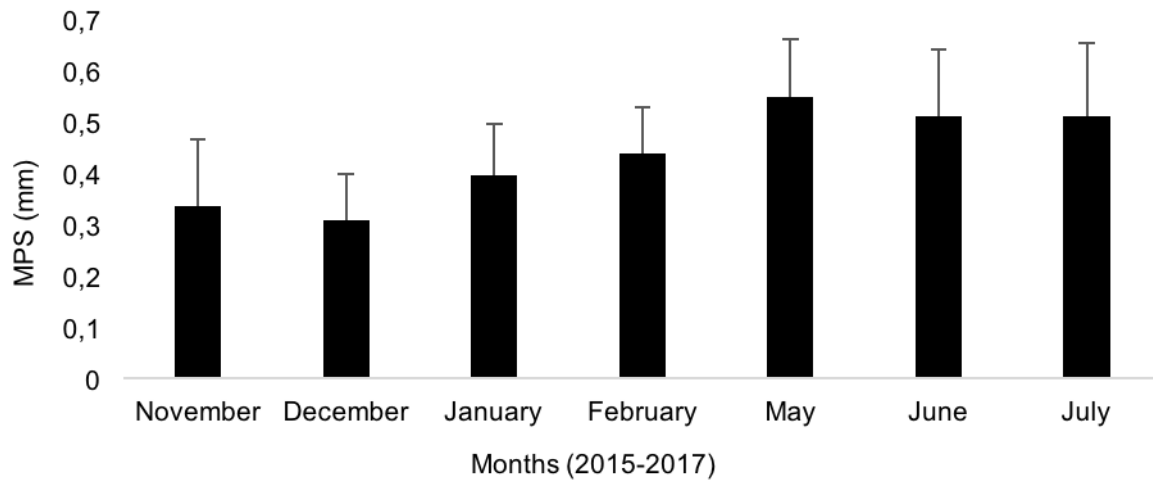


Figure 41. Variation in proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) MPS over the course of the observation period (November-July)

When comparing $MPS_{(0.025-8mm)}$ of proboscis monkeys across seasons, we observe that MPS is significantly smaller during the wet season than the dry season ($MPS_{wet} = 0.38 \pm 0.11$ mm, $MPS_{dry} = 0.52 \pm 0.13$ mm; t-test $t = -6.2812$, $p < 0.001$) (Figure 42).

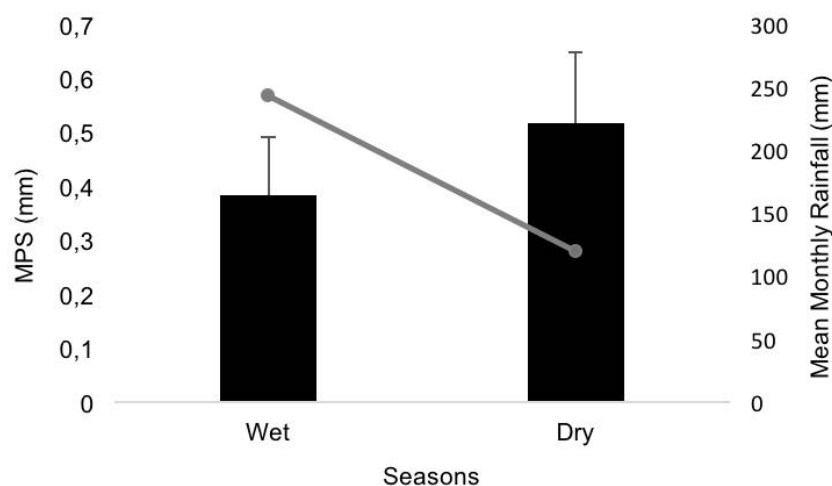


Figure 42. MPS variation of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) across seasons

Table 6 summarises 4 MPS measurements. Using a series of 10 sieves (with both smallest mesh sizes 0.040 and 0.025 mm) resulted in finer MPS than calculation with the 8-sieve cascade. MPS

measurements were significantly larger when including the maximum particle length (MPL) for the largest sieve in the calculation.

Table 6. Mean particle size $\pm$ SD of 28 faecal samples of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) measured using two series of sieves (indicated by the sieve size of the smallest and largest sieves) and with or without taking the maximum particle length (MPL, when particles were retained on the largest sieve) into account in the MPS calculation

Method	MPS $\pm$ SD (mm)
0.025-8 MPL	0.48 ± 0.11
0.025-8	0.47 ± 0.11
0.063-8 MPL	0.59 ± 0.11
0.063-8	0.57 ± 0.10

4.5 Discussion

This study focused on proboscis monkeys' faecal samples collected between 2015 and 2017, during wet and dry seasons. We confirm the very small discrete mean faecal particle size in proboscis monkey ($\text{MPS}_{(0.025-8\text{mm})} = 0.45 \pm 0.14$ mm), for its average body mass. We measured a $\text{MPS}_{(0.063-8\text{mm})}$ of 0.55 ± 0.14 mm, similar to the results of a previous study ($\text{MPS}_{(0.063-16\text{mm})} = 0.53 \pm 0.09$ mm) obtained by analysing 10 samples collected in June-July 2010 (Matsuda *et al.*, 2014b). The fine MPS indicates the generally high chewing efficiency of proboscis monkeys. For example, in comparison, frugivorous primates in Borneo, such as macaques (*Macaca fascicularis* and *M. nemestrina*) and orangutans (*Pongo pygmaeus*), have larger $\text{MPS}_{(0.063-16\text{mm})}$ respectively ranging from 1.07 ± 0.47 to 2.30 ± 0.78 mm (Matsuda *et al.*, 2014b).

We observed that MPS is even smaller during the wet season than the dry season. The same pattern had been observed in folivorous gelada baboons (Venkataraman *et al.*, 2014). The latter showed a lower MPS in wet season when consuming less tough food items. In our study, the MPS difference might also be linked to a change in diet. Smaller MPS values during the wet season correlate with high percentage of intact seeds in faeces, suggesting individuals might consume more fruits and their seeds. However, this assumption must be considered carefully, as the absence of seeds in faeces does not always imply that individuals did not eat fruits (i.e. seeds could be totally digested, chewed or discharged). Mismatches have been observed between proboscis monkey fruit feeding activity and seeds detected in faeces (Matsuda *et al.*, 2013a). Primates, including proboscis monkeys, usually avoid feeding on tough leaves or leaf parts (Hill & Lucas, 1996; Teaford *et al.*, 2006; Dunham & Lambert, 2016; Matsuda *et al.*, 2017). The same pattern is observed in chimpanzees where fallback foods are significantly tougher than preferred items (fruits) (Vogel *et al.*, 2008). However, in Bornean orangutans

(*P. p. wurmbii*), mechanical properties of leaves and fruits did not vary significantly (Vogel *et al.*, 2008). In the present study, we did not analyse the toughness of food items fed on by proboscis monkeys. However, in comparison to leaves, fruits and seeds are generally considered as high quality food (Milton, 1993; Hanya & Bernard, 2015). Containing less fibre, fruits generally are more digestible than leaves (Milton, 1993); consumption of unripe fruits may lead to smaller MPS. Further work should investigate nutritional and mechanical properties of unripe fruits and their seeds consumed by the proboscis monkey to better understand the feeding selection in this endangered primate.

As in gelada baboons, we suggest here that fallback food consumption during some parts of the year leads to a reduction of chewing efficiency which might potentially negatively impact the animals' fitness (Venkataraman *et al.*, 2014). There is preliminary evidence that 'rumination' activity in proboscis monkeys is higher during times of increased leaf consumption (Matsuda *et al.*, 2014b), which could potentially attenuate the change in MPS associated with leaves. If this was a general pattern, then the MPS difference between the seasons obtained in the present study should be of a lower magnitude than in other arboreal primates that show a seasonal foraging pattern but do not 'ruminate'. Compared to geladas with a seasonal MPS difference of 0.3-0.4 mm in prime adults, the proboscis monkeys of the present study did show a lower difference (0.14 mm, Figure 42). However, due to diet differences between hindgut fermenter geladas and foregut fermenter proboscis monkeys, this comparison should be treated cautiously. We suggest further studies should determine whether proboscis monkey individuals achieve finer MPS when they 'ruminate' as opposed to times when they do not. Such data could help unravel the relevance of facultative rumination as a response to diet constraints. Finally, future research should also investigate if seasonal changes in MPS are also measured in other colobine primates, as data is missing so far.

Acknowledgments

We thank the Sabah Wildlife Department and Sabah Biodiversity Centre for allowing us to carry out our research in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary. We thank our Belgian financial funders: the FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique), FNRS Gustave Boël-Sofina fellowship 2016 and the Fonds Léopold III – pour l'Exploration et la Conservation de la Nature asbl. Thanks to all students and research assistants at Danau Girang Field Centre who helped us in the field.

Disclosure statement

All co-authors guarantee that no conflict of interest is related to this research.

References

- Bauchop T, Martucci, RW (1968). Ruminant-like digestion of the langur monkey. *Science, New Series* 161: 698–700.
- Bjorndal KA, Bolten AB, Moore JE (1990). Digestive fermentation in herbivores: Effect of food particle size. *Physiological Zoology* 63: 710–721.
- Clauss M, Lechner-Doll M, Streich WJ (2002). Faecal particle size distribution in captive wild ruminants: An approach to the browser/grazer dichotomy from the other end. *Oecologia* 131: 343–349.
- Clauss M, Steuer P, Erlinghagen-Lückerath K, Kaandorp J, Fritz J, Südekum K-H, Hummel J (2015). Faecal particle size: Digestive physiology meets herbivore diversity. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 179: 182–191.
- Dunbar RIM, Bose U (1991). Adaptation to grass-eating in gelada baboons. *Primates* 32: 1–7.
- Dunham NT, Lambert AL (2016). The role of leaf toughness on foraging efficiency in Angola black and white colobus monkeys (*Colobus angolensis palliatus*). *American Journal of Physical Anthropology* 161: 343–354.
- Fritz J, Hummel J, Kienzle E, Arnold C, Nunn C, Clauss M (2009). Comparative chewing efficiency in mammalian herbivores. *Oikos* 118: 1623–1632.
- Fritz J, Streich WJ, Schwarm A, Clauss M (2012). Condensing results of wet sieving analyses into a single data: A comparison of methods for particle size description. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96: 783–797.
- Hanya G, Bernard H (2015). Different roles of seeds and young leaves in the diet of red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*): Comparisons of availability, nutritional properties, and associated feeding behavior. *International Journal of Primatology* 36: 177–193.
- Hill DA, Lucas PW (1996). Toughness and fiber content of major leaf foods of Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*) in Yakushima. *American Journal of Primatology* 38: 221–231.
- Matsuda I, Clauss M, Tuuga A, Sugau J, Hanya G, Yumoto T, Bernard H, Hummel J (2017). Factors affecting leaf selection by foregut-fermenting proboscis monkeys: New insight from in vitro digestibility and toughness of leaves. *Scientific Reports* DOI:10.1038/srep42774.
- Matsuda I, Higashi S, Otani Y, Tuuga A, Bernard H, Corlett RT (2013). A short note on seed dispersal by colobines: The case of the proboscis monkey. *Integrative Zoology* 8:395–399.
- Matsuda I, Murai T, Clauss M, Yamada T, Tuuga A, Bernard H, Higashi S (2011a). Regurgitation and remastication in the foregut-fermenting proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Biology letters* 7: 786–789.
- Matsuda I, Tuuga A, Bernard H (2011b). Riverine refuging by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) and sympatric primates: Implications for adaptive benefits of the riverine habitat. *Mammalian Biology* 76: 165–171.
- Matsuda I, Tuuga A, Hashimoto C, Bernard H, Yamagiwa J, Fritz J, Tsubokawa K, Yayota M, Murai T, Iwata Y, Clauss M (2014). Faecal particle size in free-ranging primates supports a “rumination” strategy in the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Oecologia* 174: 1127–1137.
- Matsuda I, Tuuga A, Higashi S (2009). The feeding ecology and activity budget of proboscis monkeys. *American Journal of Primatology* 71: 478–492.
- Milton K (1993). Diet and primate evolution. *Scientific American* 269: 86–93.
- Nygren K, Hofmann, RR (1990). Seasonal variations of food particle size in Moose. *Alces* 26: 44–50.
- R Development Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. R 3.4.0 GUI 1.70. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- Renecker LA, Hudson RJ (1990). Digestive kinetics of moose (*Alces alces*), wapiti (*Cervus elaphus*) and cattle. *Animal Production* 50: 51–61.
- Teaford MF, Lucas PW, Ungar PS, Glander KE (2006). Mechanical defenses in leaves eaten by Costa Rican howling monkeys (*Alouatta palliata*). *American Journal of Physical Anthropology* 129: 99–104.
- Venkataraman VV, Glowacka H, Fritz J, Clauss M, Seyoum C, Nguyen N, Fashing PJ (2014). Effects of dietary fracture toughness and dental wear on chewing efficiency in geladas (*Theropithecus gelada*). *American Journal of Physical Anthropology* 155: 17–32.
- Vogel ER, van Woerden JT, Lucas PW, Utami Atmoko SS, van Schaik CP, Dominy NJ (2008). Functional ecology and evolution of hominoid molar enamel thickness: *Pan troglodytes schweinfurthii* and *Pongo pygmaeus wurmbii*. *Journal of Human Evolution* 55: 60–74.
- Weary TE, Wrangham RW, Clauss M (2017). Applying wet sieving fecal particle size measurement to frugivores: A case study of the eastern chimpanzee (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *American Journal of Physical Anthropology* 163: 510–518

Supplementary material

Figure 1S is an updated version of Fig. 42, showing the distribution of MPS and rainfall values throughout all months of the study.

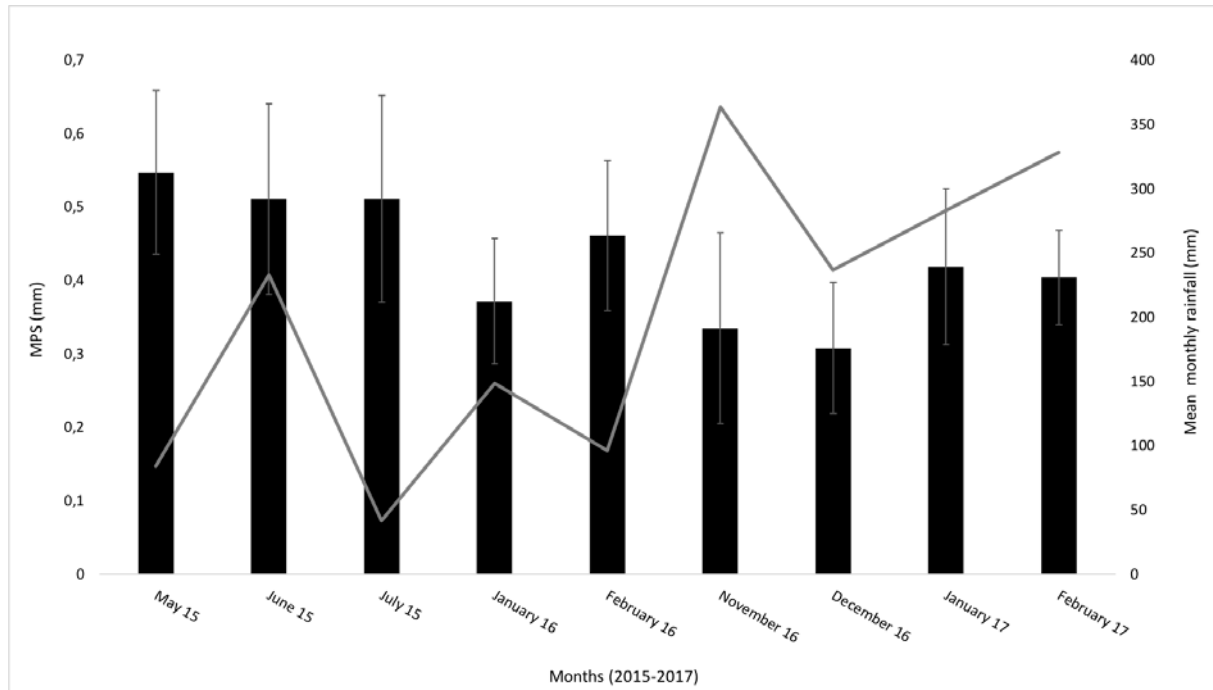
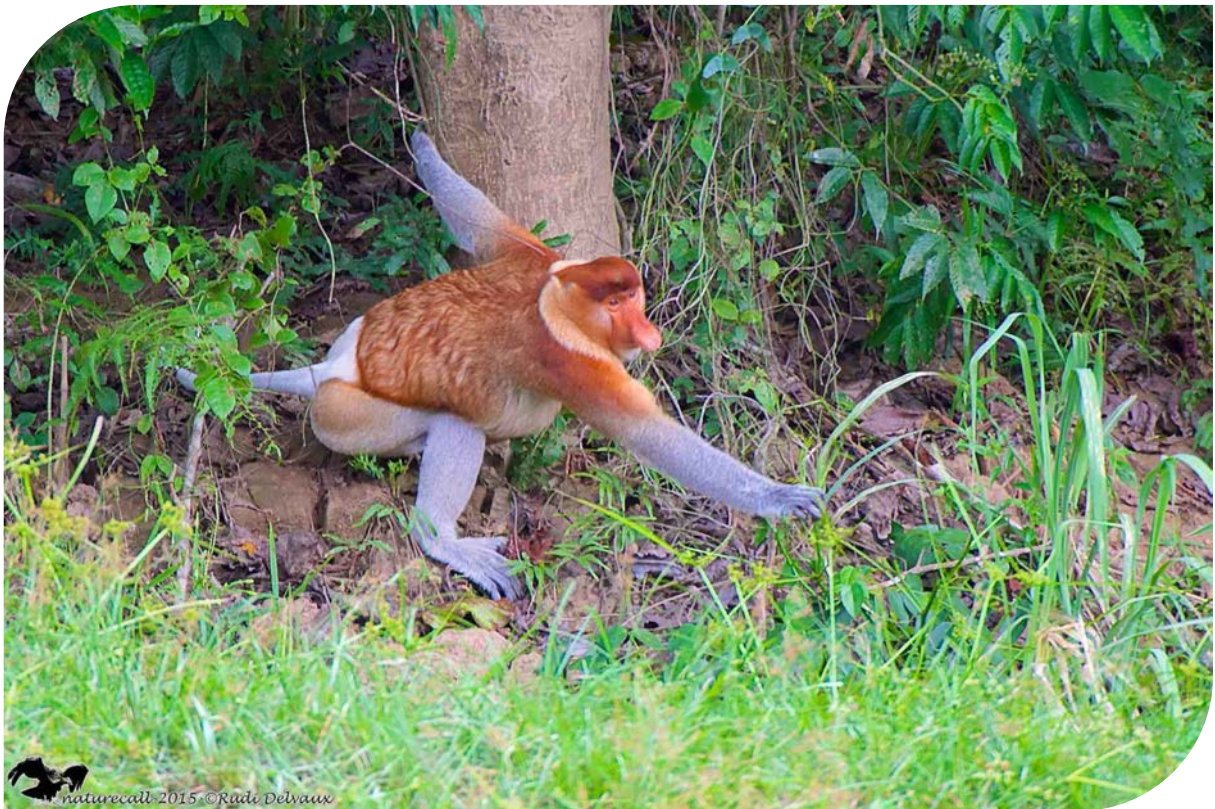


Fig. 1S. MPS variation of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) and mean monthly rainfall over the course of the study (May 2015-February 2017)

5 Aspects nutritionnels des aliments consommés par *Nasalis larvatus*



Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les MPS chez *Nasalis larvatus* étaient plus petites en saison des pluies qu'en saison sèche. L'hypothèse développée est la suivante : en saison des pluies, les nasiques consomment davantage de fruits – plus digestes que les jeunes feuilles – engendrant des MPS plus petites. Ici, nous nous intéressons à la composition nutritionnelle des aliments (jeunes feuilles et fruits immatures) consommés par les nasiques dans le *LKWS*. Nous mettons en évidence des compositions nutritionnelles et minérales différentes selon l'espèce de plante consommée, le type d'aliment (jeune feuille ou fruit immature) ingéré et la distance au cours d'eau. Nous soulignons l'importance de considérer *Ficus racemosa* dans les futurs plans de restauration du paysage, tels que l'établissement de corridors forestiers et la réhabilitation des zones riveraines.

Ce chapitre correspond à un article en préparation :

Thiry V., Vairappan C.S., Stark D.J., Kastally C., Beudels-Jamar R.C., Vercauteren Drubbel R., Nathan S.K.S.S., Goossens B., Vercauteren M. **(in prep.)** Nutritional content of proboscis monkey food along the Kinabatangan River, Sabah.

Nutritional content of proboscis monkey food along the Kinabatangan River, Sabah.

Authors:

Valentine Thiry^{ab}, Charles S. Vairappan^c, Danica J. Stark^{de}, Chedly Kastally^f, Roseline C. Beudels-Jamar^b, Régine Vercauteren Drubbel^a, Senthilvel K. S. S. Nathan^g, Benoît Goossens^{degh}, Martine Vercauteren^a

^a Anthropology and Human Genetics Unit, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

^b Conservation Biology Unit, Education and Nature, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels, Belgium;

^c Institute for Tropical Biology and Conservation, Universiti Malaysia Sabah, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia;

^d Danau Girang Field Centre, c/o Sabah Wildlife Department, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia;

^e Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Sir Martin Evans Building, Cardiff, UK;

^f Evolutionary Biology and Ecology Unit, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

^g Sabah Wildlife Department, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia;

^h Sustainable Places Research Institute, Cardiff University, Cardiff, UK.

*** Corresponding author**

Valentine Thiry: valentinethiry89@gmail.com , 0032473563831

5.1 Abstract

Feeding is central to animals' biology. Different factors, such as nutritional composition or food availability, influence the diet in primates. In this study, we investigated the nutritional composition of food consumed by proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*, in the secondary forests of the Lower Kinabatangan Floodplain. Proboscis monkeys followed the general trend of the colobine diet, feeding on young leaves rich in protein and with a high protein-to-fibre ratio. *F. racemosa* had high quality young leaves (high protein, ash and potassium content) compared to other consumed plant species. Unripe fruits with seeds contained more lipids but less protein than young leaves of the same species. Finally, young leaves near the riverside contained more protein, calcium and a higher protein-to-fibre ratio than young leaves sampled further inside the forest (> 250 m away from the river). While river refuging by proboscis monkeys is largely associated with anti-predation behaviour, our findings suggest that food quality at the riverside may also influence their ranging patterns in the floodplain. Finally, this study brings new insights on proboscis monkey feeding ecology. Particularly, *F. racemosa* is crucial for proboscis monkeys in riverine habitats and should be carefully incorporated in conservation planning, such as in forest restoration plans and corridor establishments.

Keywords

Nasalis larvatus, Colobine, Food composition, Minerals, Riverine forest, *Ficus racemosa*

5.2 Introduction

Feeding plays a crucial role in all animal biology, including primates (Lambert, 2010). Many factors are known to influence diet selection in primates: food availability, nutritional, chemical and mechanical properties of food (Lambert, 2010), costs related to food consumption (e.g. risk of predation (Miller, 2002), food competition (Janson, 1988)), as well as gut morphology (Milton, 1998), body size (Gaulin, 1979) and reproductive status (McCabe & Fedigan, 2007). Nutritional requirements vary among primate taxa and include a combination of proteins, carbohydrates, lipids, minerals, vitamins and water (Lambert, 2010).

Studying the nutritional content of foods consumed by primates is essential to understand their feeding ecology (Lambert, 2010). Moreover, information on species' nutritional choices can be used to build relevant conservation plans (Chapman *et al.*, 2004; Felton *et al.*, 2010). In colobines, a diet rich in protein and low in fibre (Oates *et al.*, 1980; Davies *et al.*, 1988; Kool, 1992; Chapman *et al.*, 2004; Fashing *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2013b), with a high protein-to-fibre ratio, is known to influence food choices and be a good indicator for predicting their biomass in forests. Therefore, this protein-to-fibre ratio could be used as an indicator to select trees and areas that need to be protected in order to ensure the survival of endangered colobine species (Chapman *et al.*, 2004).

Proboscis monkey, *Nasalis larvatus*, is a colobine primate endemic to the island of Borneo. The species is mostly restricted to riparian, mangrove and peat-swamp forests (Meijaard & Nijman, 2000a; Meijaard *et al.*, 2008). Threatened by the loss of its forested habitats, the species is listed as Endangered (IUCN, 2019). Similar to other colobines, proboscis monkeys mostly feed on young leaves, unripe fruits and seeds (Matsuda *et al.* 2009b; Yeager 1989).

In riverine habitats, proboscis monkeys are highly associated with water bodies, foraging inland (up to 800 m from the riverbank) during the day and returning to the riverside where they spend the night (Matsuda *et al.* 2009a), but inland sleeping occurs more as the moon waxes and temperatures are high (Stark, 2018). To date, anti-predator strategies are the main explanations for this river refuting behaviour (Matsuda *et al.*, 2008b; Feilen & Marshall, 2014). However, it is still unclear why taking refuge near the river is more common in proboscis monkeys than in other sympatric primates (Matsuda *et al.*, 2011b). Some authors (Matsuda *et al.*, 2013b) hypothesised that proboscis monkeys might be constrained to range in flooded areas in order to feed on high-quality leaves – with a high protein and mineral content – in order to maintain their large body mass.

To our knowledge, previous studies essentially focused on the nutritional value of young leaves consumed by proboscis monkeys (Yeager *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 2013b), but did not investigate how nutrient content in young leaves varied in regard to the distance from rivers, though it may affect the phytochemical contents of plant parts (Matsuda *et al.*, 2013b); nor analyse unripe fruits and seeds that proboscis monkeys even preferentially consume during some parts of the year (Matsuda *et al.*,

2009b). This knowledge is essential to provide a better understanding on the dietary choice and nutritional ecology of this endangered primate.

In this study, we aimed to better understand the feeding ecology of proboscis monkeys in fragmented riverine forests of the Lower Kinabatangan Floodplain. To this end, we investigated the nutritional content of young leaves consumed by proboscis monkeys at riverbank and assessed whether the content changed among species. Secondly, riverside plants were investigated by comparing the content of young leaves to that of unripe fruits. Finally, the influence of river distance was assessed by comparing the content of young leaves collected at the riverside to that of young leaves sampled more than 250 meters away from the main river and its tributaries. We expected that: (1) proboscis monkeys would follow the general trend of other colobine species, feeding on young leaves with a high protein-to-fibre ratio (Yeager et al. 1997); (2) unripe fruits would contain less protein than young leaves (Milton 1993); and (3) young leaves collected at the riverside would be of higher quality (higher protein and mineral contents) than young leaves sampled further inside the forest (Matsuda *et al.*, 2013b).

5.3 Methods

5.3.1 Study site

This study was conducted between 2015 and 2017 (from May 2015 to August 2015, January 2016 to June 2016, and November 2016 to March 2017), in the Lower Kinabatangan Floodplain (LKF, 5°20'-05°45'N, 117°40'-118°30'E), in eastern Sabah (Malaysian Borneo). The LKF is composed of dry lowland forests, seasonal and permanent swamps (Abram *et al.*, 2014). More precisely, this work took place inside Lots 5, 6 and 7 of the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary (LKWS).

5.3.2 Plant collection

We focused our analyses on 10 plant species that were often consumed by proboscis monkeys in our study site. Together, these species account for 84.2 % of feeding occurrences recorded by direct behavioural observations at riverside, with most of them (n=8) potentially corresponding to plant taxa (i.e., genera or families) that were frequently (20 top-key food plants) detected in proboscis monkey faeces by using a DNA metabarcoding approach (Thiry in prep.). For these 10 species, we sampled young leaves in four to eight individual trees or vines located along the Kinabatangan River (N=74 trees or vines). We also collected unripe fruits of *Nauclea orientalis* (N=8) and *Ficus racemosa* (N=8). Based on our behavioural observations, when proboscis monkeys consume these multi-seeded fruits, they eat the flesh and seeds together. Therefore, we used the entire fruit for nutritional analyses. Moreover, in five out of the 10 feeding species, we also sampled young leaves in individuals (N=5-7) located > 250 m from the main river and tributaries (N=28). Out of the collected samples, 118 were analysed (Table 7).

Table 7. Ten plant species consumed by proboscis monkeys along the Kinabatangan River during the study and sampled for nutritional analyses (with N = number of sampled individuals).

Species	Young leaves at riverbank	Young leaves > 250 m	Unripe fruits at riverbank
<i>Bridelia stipularis</i>	8	5	
<i>Colona serratifolia</i>	8	5	
<i>Dillenia excelsa</i>	4	7	
<i>Ficus fistulosa</i>	8		
<i>Ficus racemosa</i>	8		8
<i>Lophopyxis maingayi</i>	8	6	
<i>Nauclea orientalis</i>	8		8
<i>Octomeles sumatrana</i>	8		
<i>Pterospermum elongatum</i>	6		
<i>Vitex pinnata</i>	8	5	

We sampled plants between December 2016 and February 2017. We used a pruner pole to collect approximately 100 g of fresh samples (young leaves or unripe fruits) from each tree or vine individual. Back at the field station (*Danau Girang Field Centre*, in Lot 6 of the LKWS), we weighed the samples, placed them in paper bags and then dried the samples in an oven for approximately 72 hours at 40 °C. Dried samples were then stored in plastic bags. Once at the Institute for Tropical Biology and Conservation (Universiti Malaysia Sabah), samples were ground before running nutritional and mineral analyses.

5.3.3 Nutritional and Mineral Analyses

Crude protein (CP) content was calculated using the Kjeldhal procedure for total nitrogen. As pure protein is generally composed of 16% nitrogen, a widely used estimate of crude protein content in a sample is obtained by multiplying its content in nitrogen by 6.25 (Rothman *et al.*, 2012). Crude lipid (CLipid) content was determined by the Soxhlet method (Soxhlet, 1979), using petroleum ether for extraction. Acid detergent fibre (ADF) was measured with an Ankom Fiber Analyzer (ANKOM2000) (Berchielli *et al.*, 2001). By burning samples in an oven at 550 °C for 6 hours and weighing them, we determined their crude ash (Ash) content (i.e. inorganic matter) (Rothman *et al.*, 2012); crude ash is generally considered as the plants' mineral content (Ortmann *et al.*, 2006). Tannins were determined by the 96-well plate HCl-vanillin assay (Herald *et al.*, 2014). The catechin standard curve was developed using a concentration range of 0.03125 – 1 mg mL⁻¹. Minerals (Ca [calcium], Cu [copper], K [potassium], Mg [magnesium], Mn [manganese], and Zn [zinc]) were analysed via inductively coupled plasma mass spectrometry.

5.3.4 Statistical Analyses

Analyses were conducted with R (version 3.4.3) with a statistical significance of $P < 0.05$ (R Development Core Team, 2017). Spearman rank correlation was carried out to test the relation between the nutrients, crude ash and tannin contained in young leaves. To investigate whether nutrient, mineral and tannin compositions would show interspecific variations (cf. Chapman *et al.* 2003), we conducted analyses of variance (ANOVA, Welch's Anova or Kruskal-Wallis, according to the distribution of model residuals and the homogeneity of variances) using the package *userfriendlyscience* (Peters, 2018). These analyses compared young leaves' contents among all 10 species. We performed Tukey HSD post-hoc tests after Anova; Games-Howell post-hoc tests after Welch's Anova and Kruskal-Wallis. Additionally, we performed a Principal Component Analysis (PCA, function *prcomp* from the package *stats* (R Development Core Team, 2017)) using our observations for CP, ADF, CP/ADF, CLipid, Ash and Tannin variables. PCA is a statistical procedure that projects a set of observations into a series of linearly uncorrelated variables called principal components (PCs), with the first PC defined in such a way that it accounts for as much of the variability in the data as possible. Finally, Mann-Whitney *U* tests were used to compare the content in macronutrients ADF, CP, CP/ADF, CLipid, ash, tannin and minerals between: (A) young leaves and unripe fruits (two species) and (B) young leaves collected at the riverbank and young leaves collected inland (> 250 m from the main river and tributaries, five species) (see Table 7).

5.4 Results

5.4.1 Nutrient, tannin and mineral content of young leaves

Table 8 summarises the mean ($\pm$ SD) nutrient, tannin and mineral content of young leaves along the riverside. The crude protein content of young leaves was significantly negatively correlated to ADF (Spearman rank correlation test: $r=-0.27$, $N=74$, $P=0.02$) and tannin ($r=-0.46$, $N=74$, $P<0.001$) values.

Table 8. Nutrient, tannin and mineral content (Mean $\pm$ SD) of young leaves (N=74, 10 species) consumed by proboscis monkeys sampled along the Kinabatangan riverside.

Properties	Mean	SD
Nutrient and tannin (in % dry matter)		
CP	14.11	3.89
ADF	32.55	9.80
CP/ADF	0.50	0.27
CLipid	3.89	2.19
Ash	6.95	1.62
Tannin	1.10	1.08
Minerals (in mg/kg dry matter)		
Ca	2,749.31	1,394.57
Mg	2,008.93	510.11
Mn	90.11	53.90
Zn	75.76	48.68
K	22,010.74	6,130.30
Cu	31.20	32.31

The content of lipids (CLipid) (Anova: $F=0.73$, $df=9$, $P=0.68$), Mn (Anova: $F=1.09$, $df=9$, $P=0.39$) and Zn (Anova: $F=1.75$, $df=9$, $P=0.10$) in young leaves did not differ significantly among the 10 food species investigated in the current study. However, the content of young leaves in CP, CP/ADF, ADF, Ash, tannin and other minerals (Ca, Cu, K and Mg) showed significant differences among at least two of the 10 food species: CP (Anova: $F=8.33$, $df=9$, $P<0.001$), ADF (Welch's Anova: $F=35.49$, $df=9$, $P<0.001$), CP/ADF (Kruskal-Wallis: $\chi^2=55.02$, $df=9$, $P<0.001$), Ash (Kruskal-Wallis: $\chi^2=42.29$, $df=9$, $P<0.001$), Tannin (Welch's Anova: $F=74.43$, $df=9$, $P<0.001$) (Figure 43), Ca (Anova: $F=21.98$, $df=9$, $P<0.001$), Cu (Anova: $F=2.84$, $df=9$, $P=0.01$), K (Anova: $F=13.15$, $df=9$, $P<0.001$) and Mg (Anova: $F=9.79$, $df=9$, $P<0.001$) (Figure 44). *Ficus racemosa*, the most consumed plant species at the riverside (Thiry, in prep.), showed high Ash, CP and K contents. Indeed, *F. racemosa*, with *Ficus fistulosa*, showed a higher content in Ash than the other consumed species. Moreover, the young leaves of *F. racemosa* contained more CP than the young leaves of four other species (including *F. fistulosa*). Finally, along with *Octomeles sumatrana* (the second most eaten species at the riverside (Thiry, in prep)), *F. racemosa* presented high levels of K in its young leaves (Figure 43, Figure 44).

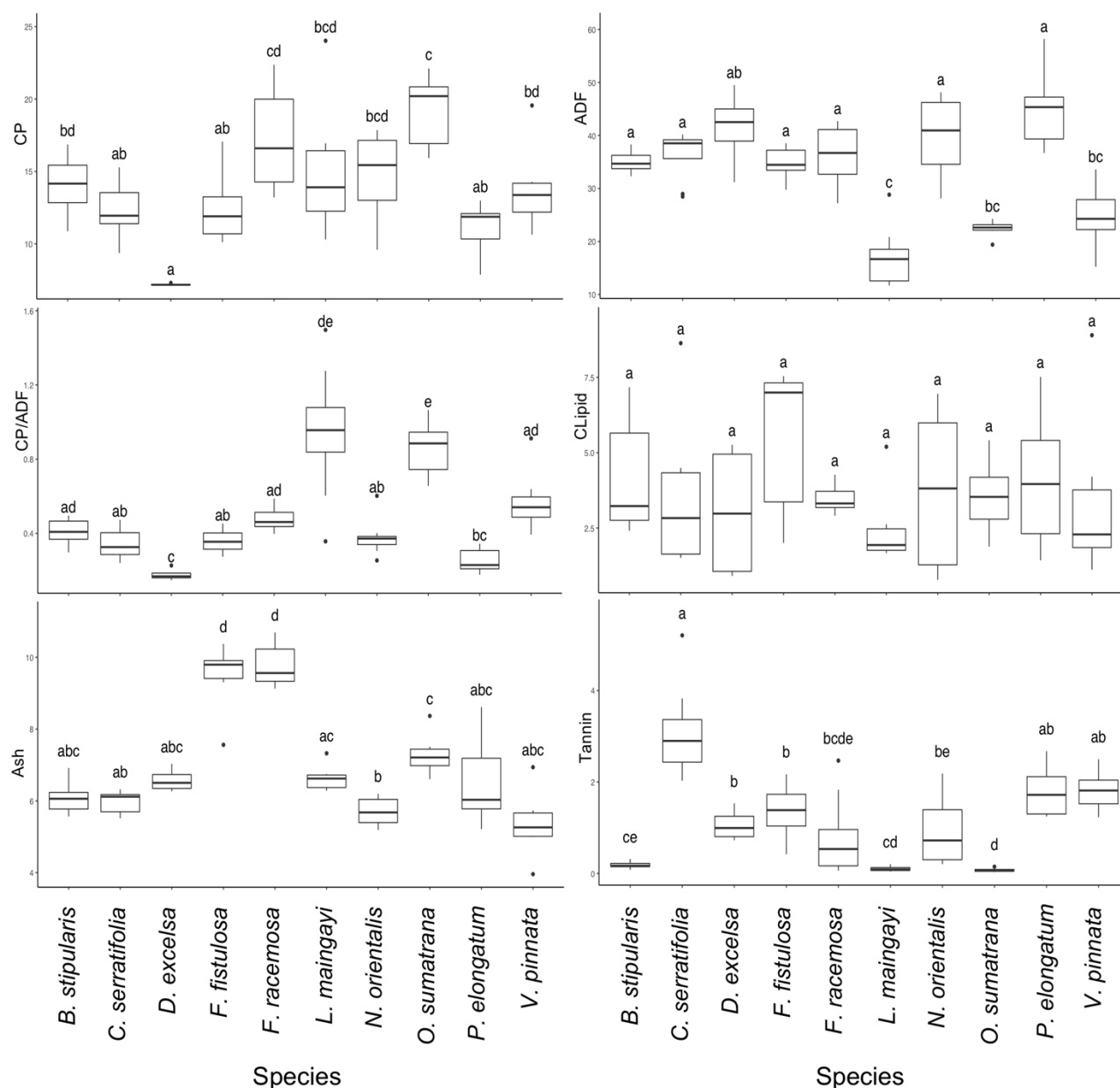


Figure 43. Nutritional, crude ash and tannin content (%) of the young leaves from 10 of the plant species consumed by proboscis monkeys.

* Letters above the boxplot distribution indicate Tukey HSD and Games-Howell post-hoc test results, with different (combinations of) letters indicating significant differences between species and similar (combinations of) letters indicating non-significant differences between species. CLipid and Tannin data were power transformed before analyses (0.22 and 0.14, respectively).

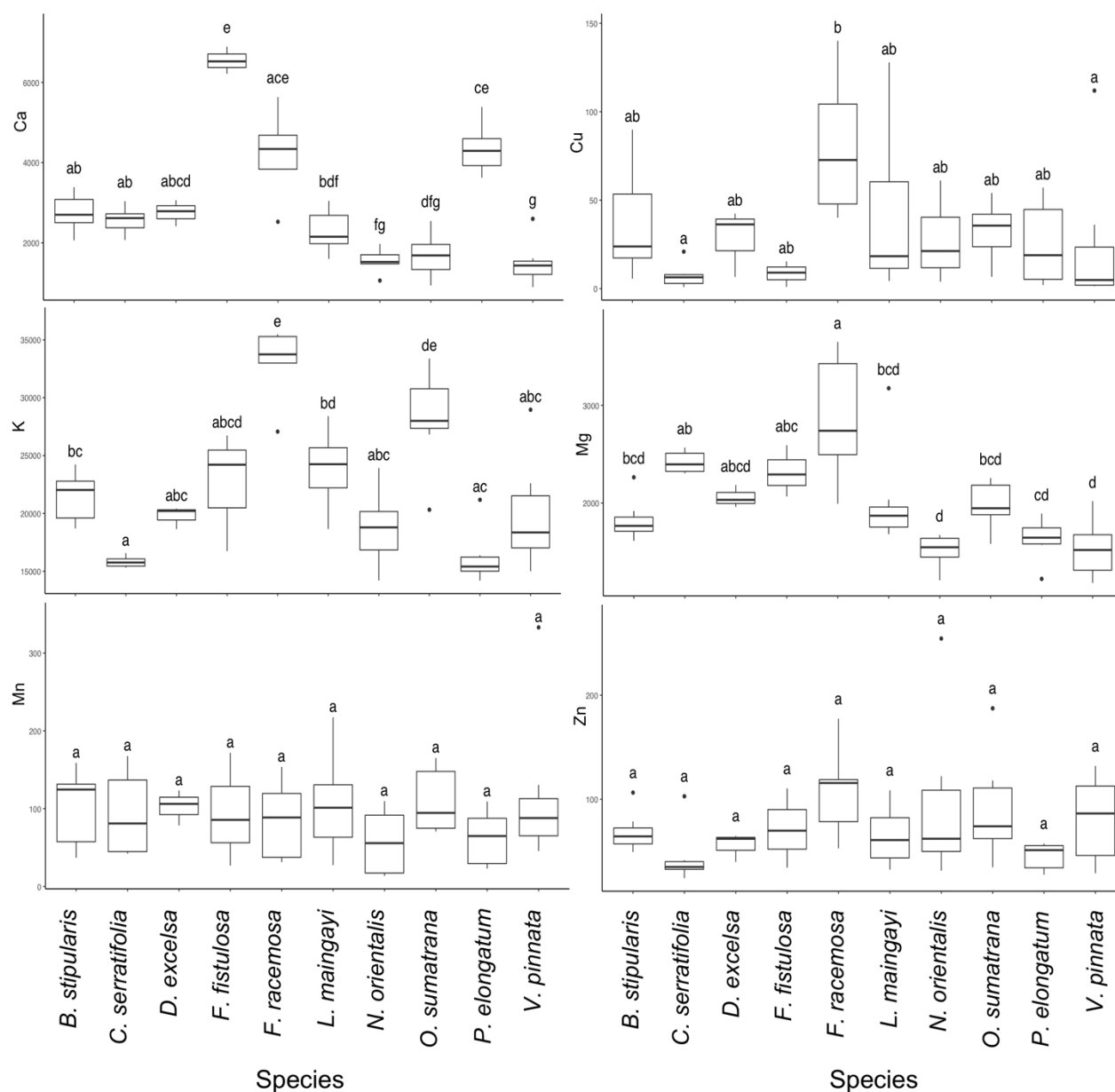


Figure 44. Mineral content (%) of the young leaves from 10 of the plant species consumed by proboscis monkeys.

* Letters above boxplot distribution indicate Tukey HSD post-hoc test results, with different (combinations of) letters indicating significant differences between species and similar (combinations of) letters indicating non-significant differences between species. Ca and Cu were log transformed, and K, Mg, Mn and Zn power transformed before analyses (-0.14, -0.34, 0.3 and -0.3, respectively).

The first and second Principal Components of the PCA explain more than 61% of the variance (Figure 45) within the data set. CP, CP/ADF, ADF and Tannin are highly correlated to the first component (42.8 %), while Ash and CLipid are highly correlated to the second component (19.1 %) (Table 9). We observe that *Ficus racemosa* and *Octomeles sumatrana* are mostly grouped in the right-top corner of the figure (Figure 45).

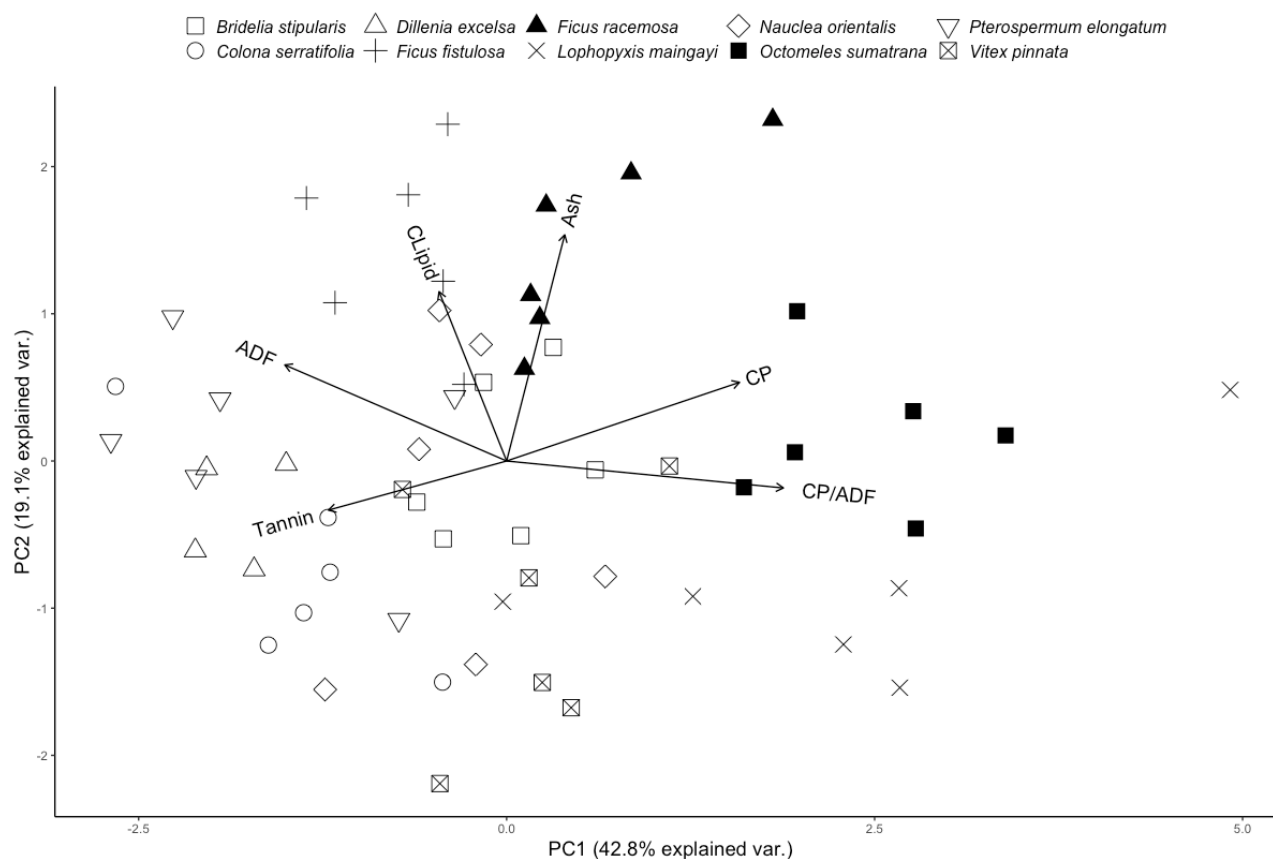


Figure 45. Graphic representation of the Principal Component Analysis performed using the CP, ADF, CP/ADF, CLipid, Ash and Tannin variables.

* Each point represents one species individual (young leaves) sampled at the riverside. Each variable is represented by an arrow corresponding to its projection onto the first two principal components.

Table 9. Values of the variables (ADF, CP, CP/ADF, CLipid, Ash and Tannin) used in the Principal Component Analysis

Variables	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
ADF	-0.473	0.306	-0.297	0.391	-0.443	-0.494
CP	0.497	0.251	0.066	0.177	-0.699	0.407
CP/ADF	0.59	-0.086	0.233	-0.063	-0.05	-0.764
CLipid	-0.144	0.54	0.748	0.266	0.24	0.019
Ash	0.124	0.721	-0.336	-0.574	0.14	-0.05
Tannin	-0.380	-0.157	0.426	-0.641	-0.485	-0.062

5.4.2 Young leaves vs. unripe fruits

Young leaves from *Nauclea orientalis* and *Ficus racemosa* showed a higher content of CP, a higher CP/ADF ratio but contained less lipid than unripe fruits from the same species (Table 10). Mg was the only mineral found in higher concentration in young leaves than in unripe fruits (Table 11).

Table 10. Comparison of nutritional, tannin and crude ash composition (mean ($\pm$ SD), in % dry matter) of young leaves and unripe fruits (*Nauclea orientalis* and *Ficus racemosa*) consumed by proboscis monkeys at the riverside.

Food items	CP	ADF	CP/ADF	CLipid	Ash	Tannin
Young Leaves	16.01 (3.54)	38.04 (6.74)	0.43 (0.1)	3.67 (1.8)	7.39 (2.19)	0.85 (0.78)
Unripe fruits	7.79 (1.43)	41.9 (8.58)	0.19 (0.05)	6.6 (1.77)	6.34 (0.94)	0.42 (0.32)
P	<0.001	0.27	<0.001	<0.001	0.27	0.16

* Results of Mann-Whitney *U* tests.

Table 11. Comparison of mineral content (mean ($\pm$ SD), in mg/kg dry matter) of young leaves and unripe fruits (*Nauclea orientalis* and *Ficus racemosa*) consumed by proboscis monkeys at the riverside.

Food items	Ca	Mg	Mn	Zn	K	Cu
Young leaves	2,954.92 (1,582.06)	2,191.58 (752.63)	70.96 (45.50)	102.08 (66.30)	24,858.46 (7,160.71)	48.28 (41.30)
Unripe fruits	2,451.94 (725.46)	1,448.88 (200.28)	54.26 (52.30)	84.13 (69.50)	21,912.51 (4,560.54)	44.70 (37.70)
P	0.87	<0.001	0.22	0.27	0.45	0.92

* Results of Mann-Whitney *U* tests.

5.4.3 Young leaves at the riverside vs. inland

Young leaves from five species contained more CP and a higher CP/ADF at the riverside than further inland (Table 12). Ca was the only mineral measured more abundantly in riverside young leaves than in inland ones (Table 13).

Table 12. Comparison of nutritional, tannin and crude ash composition (mean ($\pm$ SD), in % dry matter) of young leaves of five consumed species between riverside and inside the forest (> 250 m).

Sample sites	CP	ADF	CP/ADF	CLipid	Ash	Tannin
Riverbank	12.99 (3.48)	29.79 (9.84)	0.52 (0.31)	3.75 (2.40)	6.10 (0.71)	1.27 (1.29)
Inland	11.14 (2.87)	32.96 (6.02)	0.36 (0.14)	3.29 (2.44)	6.41 (1.24)	1.75 (1.45)
P	0.02	0.25	0.02	0.30	0.72	0.08

* Results of Mann-Whitney *U* tests.

Table 13. Comparison of mineral content (mean ($\pm$ SD), in mg/kg dry matter) of young leaves of five consumed species between riverside and inside the forest (> 250 m).

Sample sites	Ca	Mg	Mn	Zn	K	Cu
Riverbank	2,293.15 (656.22)	1,918.89 (423.16)	100.66 (59.98)	63.21 (30.50)	19,785.37 (4,234.86)	26.45 (32.03)
Inland	1,940.02 (574.81)	2,079.10 (407.85)	146.10 (91.91)	85.43 (93.47)	22,216.85 (5,252.78)	14.10 (16.61)
P	0.01	0.16	0.06	0.63	0.06	0.41

* Results of Mann-Whitney *U* tests.

5.5 Discussion

5.5.1 Nutritional, tannin and mineral content of young leaves

Young leaves of the 10 investigated food species showed similar values of CP, ADF, CP/ADF, CLipid and Ash than those described in previous studies focusing on proboscis monkey food selection (Yeager *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 2013b). Mineral contents also shared the same range of concentrations as measured by Yeager *et al.* (1997). Therefore, this study confirms that proboscis monkeys follow the general colobine diet, selecting food species with a high protein-to-fibre ratio and high protein content. Feeding on plants with a higher protein-to-fibre ratio is common in folivorous primates (Milton, 1979; Ganzhorn, 2002; Hanya *et al.*, 2007). Colobines in particular, generally select a diet rich in protein but low in fibre (Oates *et al.*, 1980; Davies *et al.*, 1988; Kool, 1992; Chapman *et al.*, 2004; Fashing *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2013b), preferring young leaves over mature ones (Oates *et al.*, 1980; Milton, 1993; Yeager *et al.*, 1997). Indeed, when leaves mature, the protein and mineral content decreases as the leaves become more fibrous (Coley & Aide, 1991). Moreover, we observed that crude protein was negatively correlated with ADF and tannin contents in young leaves. Therefore, we suggest that by selecting young leaves with high protein content (i.e. by using the trichromatic colour vision and choosing red or light green coloured young leaves (Dominy & Lucas, 2001; Matsuda *et al.*, 2017), proboscis monkeys might be avoiding fibre and tannins.

Leaves are generally considered as low-quality food. Folivorous primates can develop a strategy to select plant with higher quality leaves (Milton, 1993; Hanya & Bernard, 2015), i.e. by selecting plant species containing more minerals (Oates *et al.*, 1980; Fashing *et al.*, 2007) or higher levels of protein (Hanya and Bernard 2012; Yeager *et al.* 1997). In this study, we highlighted higher leaf quality in the top consumed plant species than in other food species, with *Ficus racemosa* containing high levels of protein, crude ash and potassium (K). Essential to growth, reproduction and survival (Rode *et al.*, 2003), minerals drive animal diet selection (Zhao *et al.*, 2013). Indeed, crude ash (or mineral) contents are known to influence the leaf selection in primates (Takemoto, 2003; Hanya *et al.*, 2007). In colobines, some species feed on plants in locations where minerals are more abundant (i.e. swamps) (Oates, 1978;

Fashing *et al.*, 2007), select plant species with higher mineral concentrations (Rode *et al.*, 2003; Fashing *et al.*, 2007) or ingest soils (Davies & Baillie, 1988). However, the role minerals play in colobine digestion is still unclear (Chapman & Chapman, 2002). Crude ash has not been previously highlighted as a significant factor affecting proboscis monkeys in their diet choice (Matsuda *et al.*, 2017). We found that *F. racemosa* exhibited higher crude ash content than other consumed plant species. This different result between studies may be the consequence of different soil compositions, mineral availabilities, as well as the plant species investigated between both study sites. Here, we suggest that proboscis monkeys may select *F. racemosa* along the riverside forest for its higher protein and mineral content, especially in K, which plays a key role for animals, along with Na and Cl, in the control of osmotic pressure and acid-base balance (National Research Council, 2003).

5.5.2 Young leaves vs. unripe fruits

Compared to leaves, fruits and seeds are considered as high-quality foods (Milton, 1993; Hanya & Bernard, 2015). Fruits are rich in immediately available energy and contain less fibre (Milton, 1993). Primates usually select seeds for their lipid content (Hanya and Bernard 2015; Janson and Chapman 1999; Maisels *et al.* 1994), whereas fruit flesh is generally rich in sugar but poor in lipid and protein (Janson & Chapman, 1999). Leaves consumed by primates typically contain more protein and minerals than fruits (Silver *et al.*, 2000; Remis *et al.*, 2001) or seeds (Hanya & Bernard, 2015).

In this study, unripe fruits (and seeds) contained more lipid, but less crude protein and magnesium than young leaves. *Ficus racemosa* and *Nauclea orientalis*, the two species investigated here, produce multi-seeded fruits, for which the flesh and seeds were analysed together, potentially explaining the higher lipid content of unripe fruits (and seeds). We did not detect any difference in the fibre content between leaves and fruits, such as reported in howler monkeys diet, *Alouatta seniculus* and *A. pigra* (Ofstedal *et al.*, 1991; Silver *et al.*, 2000). To date, this study is the first to report the nutritional, mineral and tannin composition of unripe fruits and seeds consumed by proboscis monkeys. Although the fruits and seeds of only two plant species were analysed, it included *N. orientalis*, a species that contributed to 88 % of proboscis monkey fruit-feeding occurrences at the riverside (Thiry, in prep.). Depending on the season, unripe fruits and seeds can contribute to a great proportion of the monkey's diet (Matsuda *et al.*, 2009b) and their availability is considered to significantly influence habitat selection in proboscis monkeys (Matsuda *et al.*, 2011b). Therefore, we suggest further research should include additional unripe fruit and seed species consumed (or not) by proboscis monkeys to provide a better understanding of fruit selection in colobines.

5.5.3 Young leaves at the riverside vs. inland

Proboscis monkeys generally come back to riverbanks in late afternoon to spend the night (Matsuda *et al.* 2009b; but see Stark 2018). This behaviour has mostly been explained in terms of anti-

predation strategy (i.e., river proximity reducing to the landwards side the area to guard against terrestrial predators (Matsuda *et al.*, 2008a)). However, in the current study, we recorded higher protein content and protein-to-fibre ratio in young leaves sampled at the riverside than further inside the forest, suggesting the higher leaf quality at the riverside should also be considered to explain this proboscis monkey ranging pattern. Sun-light conditions along riverbanks may explain these higher protein levels (Ganzhorn, 1995). Feeding on better quality leaves had been hypothesised to help proboscis monkeys maintain their large body mass (Matsuda *et al.*, 2013b). Although we expected leaves to contain more minerals at the riverside due to flooded river waters enriching the soil (Matsuda *et al.*, 2013b), calcium was the only mineral measured in higher concentration at the riverside than inland forests (> 250 m away from the main river and tributaries). Further analyses should investigate more plant species consumed by proboscis monkeys, in the hope of reaching a deeper understanding of the leaf quality changes throughout riverine forests and its potential influence on proboscis monkey ranging behaviour.

5.6 Conclusions

This study confirmed that, as reported in previous studies (Yeager *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 2013b), proboscis monkeys follow the general trend of the colobine diet, feeding on young leaves with a high protein-to-fibre ratio. This study was the first to analyse the nutritional content of unripe fruits consumed by proboscis monkeys: unripe fruits (with seeds) contained more lipids but less protein and Mg than young leaves. Both items seem to play complementary dietary roles in proboscis monkey feeding ecology. Young leaves contained more protein, calcium and higher protein-to-fibre ratio along the riverside than further inland, suggesting that higher foliage quality along rivers could partly explain the proboscis monkey's ranging patterns in riverine habitats.

Finally, we highlighted the significance of *Ficus racemosa*, showing young leaves with higher nutritional qualities (more CP, crude ash and K) than some of the other consumed species. We emphasise the importance of *F. racemosa* in proboscis monkey ecology as a major food source along the river (Thiry in prep.), as well as for sleeping sites (Thiry *et al.*, 2016). This tree species should be considered of high importance when developing future conservation strategies, such as reforestation programs and corridor establishment.

Acknowledgments

We gratefully thank the Sabah Wildlife Department and Sabah Biodiversity Centre for allowing us to conduct our research in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary. We also thank the Forest Research Centre members, especially Dr. Joan Pererra, who kindly identified many of our plant samples. We thank our Belgian financial funders: the FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique), the Fonds Léopold III – pour l'Exploration et la Conservation de la Nature asbl., as well as the FNRS Gutave Boël-Sofina Fellowship 2016. We thank all the students who assisted in the nutritional analyses at the Institute

for Tropical Biology and Conservation (Universiti Malaysia Sabah). Last but not least, we thank all the students and research assistants at Danau Girang Field Centre who helped us in the field.

References

- Abram NK, Xofis P, Tzanopoulos J, et al (2014) Synergies for improving oil palm production and forest conservation in floodplain landscapes. *PLoS One* 9:e95388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095388>
- Berchielli TT, Sader AP de O, Tonani FL, et al (2001) Use of the ANKOM system to determine neutral detergent fiber and acid detergent fiber with different filter bags and sample amounts. *Rev Bras Zootec* 30:1572–1578. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000600027>
- Chapman CA, Chapman LJ (2002) Foraging challenges of red colobus monkeys: Influence of nutrients and secondary compounds. *Comp Biochem Physiol Part A* 133:861–875. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00209-X](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00209-X)
- Chapman CA, Chapman LJ, Naughton-Treves L, et al (2004) Predicting folivorous primate abundance: Validation of a nutritional model. *Am J Primatol* 62:55–69. <https://doi.org/10.1002/ajp.20006>
- Chapman CA, Chapman LJ, Rode KD, et al (2003) Variation in the nutritional value of primate foods: Among trees, time periods, and areas. *Int J Primatol* 24:317–333. <https://doi.org/10.1023/A:1023049200150>
- Coley PD, Aide TM (1991) Comparison of herbivory and plant defences in temperate and tropical broad-leaved forests. In: Price PW, Lewinsohn TM, Fernandes GW, Benson WW (eds) *Plant–animal interactions: Evolutionary ecology in tropical and temperate regions*. John Wiley & Sons, Inc., pp 25–49
- Davies AG, Baillie IC (1988) Soil-eating by red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*) in Sabah, Northern Borneo. *Biotropica* 20:252–258
- Davies AG, Bennett EL, Waterman PG (1988) Food selection by two South-east Asian colobine monkeys (*Presbytis rubicunda* and *Presbytis melalophos*) in relation to plant chemistry. *Biol J Linn Soc* 34:33–56. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1988.tb01947.x>
- Dominy NJ, Lucas PW (2001) Ecological importance of trichromatic vision to primates. *Nature* 410:363–366. <https://doi.org/10.1038/35066567>
- Fashing PJ, Dierenfeld ES, Mowry CB (2007) Influence of plant and soil chemistry on food selection, ranging patterns, and biomass of *Colobus guereza* in Kakamega forest, Kenya. *Int J Primatol* 28:673–703. <https://doi.org/10.1007/s10764-006-9096-2>
- Feilen KL, Marshall AJ (2014) Sleeping site selection by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in West Kalimantan, Indonesia. *Am J Primatol* 76:1127–1139. <https://doi.org/10.1002/ajp.22298>
- Felton AM, Felton A, Foley WJ, Lindenmayer DB (2010) The role of timber tree species in the nutritional ecology of spider monkeys in a certified logging concession, Bolivia. *For Ecol Manage* 259:1642–1649. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.01.042>
- Ganzhorn JU (2002) Distribution of a folivorous lemur in relation to seasonally varying food resources: Integrating quantitative and qualitative aspects of food characteristics. *Oecologia* 131:427–435. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0891-y>
- Ganzhorn JU (1995) Low-level forest disturbance effects on primary production, leaf chemistry, and lemur populations. *Ecology* 76:2084–2096
- Gaulin SJC (1979) A Jarman/Bell model of primate feeding niches. *Hum Ecol* 7:1–20. <https://doi.org/10.1007/BF00889349>
- Hanya G, Bernard H (2015) Different roles of seeds and young leaves in the diet of red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*): Comparisons of availability, nutritional properties, and associated feeding behavior. *Int J Primatol* 36:177–193. <https://doi.org/10.1007/s10764-015-9819-3>
- Hanya G, Bernard H (2012) Fallback foods of red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*) in Danum Valley, Borneo. *Int J Primatol* 33:322–337. <https://doi.org/10.1007/s10764-012-9580-9>
- Hanya G, Kiyono M, Takafumi H, et al (2007) Mature leaf selection of Japanese macaques: Effects of availability and chemical content. *J Zool* 273:140–147. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2007.00308.x>
- Herald TJ, Gadgil P, Perumal R, et al (2014) High-throughput micro-plate HCl-vanillin assay for screening tannin content in sorghum grain. *J Sci Food Agric* 94:2133–2136. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6538>
- IUCN (2019) The IUCN red list of threatened species. Version 2019-2. <https://www.iucnredlist.org/>. Accessed 13 Nov 2019
- Janson CH (1988) Intra-specific food competition and primate social structure: A synthesis. *Behaviour* 105:1–17
- Janson CH, Chapman CA (1999) Resources and primate community structure. In: Fleagle JG, Janson CH, Reed KE (eds) *Primate communities*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 237–267

- Kool KM (1992) Food selection by the silver leaf monkey, *Trachypithecus auratus sondaicus*, in relation to plant chemistry. *Oecologia* 90:527–533. <https://doi.org/10.1007/BF01875446>
- Lambert JE (2010) Primate nutritional ecology: Feeding biology and diet at ecological and evolutionary scales. In: Campbell CJ, Fuentes A, MacKinnon KC, et al. (eds) *Primates in perspective*, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, pp 512–522
- Maisels F, Gautier-Hion A, Gautier J-P (1994) Diets of two sympatric colobines in Zaire: More evidence on seed-eating in forests on poor soils. *Int J Primatol* 15:681–701. <https://doi.org/10.1007/BF02737427>
- Matsuda I, Clauss M, Tuuga A, et al (2017) Factors affecting leaf selection by foregut-fermenting proboscis monkeys: New insight from in vitro digestibility and toughness of leaves. *Sci Rep* 7:1–10. <https://doi.org/10.1038/srep42774>
- Matsuda I, Tuuga A, Bernard H, et al (2013) Leaf selection by two Bornean colobine monkeys in relation to plant chemistry and abundance. *Sci Rep* 3:1–6. <https://doi.org/10.1038>
- Matsuda I, Tuuga A, Bernard H (2011) Riverine refuging by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) and sympatric primates: Implications for adaptive benefits of the riverine habitat. *Mamm Biol* 76:165–171. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.03.005>
- Matsuda I, Tuuga A, Higashi S (2009a) The feeding ecology and activity budget of proboscis monkeys. *Am J Primatol* 71:478–492. <https://doi.org/10.1002/ajp.20677>
- Matsuda I, Tuuga A, Higashi S (2009b) Ranging behavior of proboscis monkeys in a riverine forest with special reference to ranging in inland forest. *Int J Primatol* 30:313–325. <https://doi.org/10.1007/s10764-009-9344-3>
- Matsuda I, Tuuga A, Higashi S (2008) Clouded leopard (*Neofelis diardi*) predation on proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, Malaysia. *Primates* 49:227–231. <https://doi.org/10.1007/s10329-008-0085-2>
- McCabe GM, Fedigan LM (2007) Effects of reproductive status on energy intake, ingestion rates, and dietary composition of female *Cebus capucinus* at Santa Rosa, Costa Rica. *Int J Primatol* 28:837–851. <https://doi.org/10.1007/s10764-007-9159-z>
- Meijaard E, Nijman V (2000) Distribution and conservation of the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) in Kalimantan, Indonesia. *Biological Conserv* 92:15–24
- Meijaard E, Nijman V, Supriatna J (2008) *Nasalis larvatus*. The IUCN Red List of Threatened Species
- Miller LE (2002) Eat or be eaten: Predator sensitive foraging among primates. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Milton K (1998) Physiological ecology of howlers (*Alouatta*): Energetic and digestive considerations and comparison with the Colobinae. *Int J Primatol* 19:513–548. <https://doi.org/10.1023/A:1020364523213>
- Milton K (1993) Diet and primate evolution. *Sci Am* 269:86–93. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0893-86>
- Milton K (1979) Factors influencing leaf choice by howler monkeys: A test of some hypotheses of food selection by generalist herbivores. *Am Nat* 114:362–378. <https://doi.org/10.1086/283485>
- National Research Council (2003) Nutrient Requirements of Nonhuman Primates. The National Academy Press, Washington DC
- Oates JF (1978) Water-plant and soil consumption by guereza monkeys (*Colobus guereza*): A relationship with minerals and toxins in the diet? *Biotropica* 10:241–253
- Oates JF, Waterman PG, Choo GM (1980) Food selection by the South Indian leaf-monkey, *Presbytis johnii*, in relation to leaf chemistry. *Oecologia* 45:45–56
- Oftedal OT, Whiten A, Southgate DAT, Soest P Van (1991) The nutritional consequences of foraging in primates: The relationship of nutrient intakes to nutrient requirements. *Philos Trans Biol Sci* 334:161–170
- Ortmann S, Bradley B, Stolter C, Ganzhorn JU (2006) Estimating the quality and composition of wild animal diets: a critical survey of methods. In: Hohmann G, Robbins MM, Boesch C (eds) *Feeding ecology in apes and other primates. Ecological, physical and behavioral aspects*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 395–418
- Peters G (2018) userfriendlyscience: Quantitative analysis made accessible. R package version 0.7.1
- R Development Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. R 3.4.3
- Remis MJ, Dierenfeld ES, Mowry CB, Carroll RW (2001) Nutritional aspects of western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) diet during seasons of fruit scarcity at Bai Hokou, Central African Republic. *Int J Primatol* 22:807–836. <https://doi.org/10.1023/A:1012021617737>

- Rode KD, Chapman CA, Chapman LJ, McDowell LR (2003) Mineral resource availability and consumption by *Colobus* in Kibale National Park, Uganda. *Int J Primatol* 24:541–573. <https://doi.org/10.1023/A:1023788330155>
- Rothman JM, Chapman C a., van Soest PJ (2012) Methods in primate nutritional ecology: A user's guide. *Int J Primatol* 33:542–566. <https://doi.org/10.1007/s10764-011-9568-x>
- Silver SC, Ostro LET, Yeager CP, Dierenfeld ES (2000) Phytochemical and mineral components of foods consumed by black howler monkeys (*Alouatta pigra*) at two sites in Belize. *Zoo Biol* 19:95–109
- Soxhlet F (1979) Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Polytech J* 232:
- Stark DJ (2018) Habitat use and movement of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in a degraded and human-modified forest landscape. PhD Thesis, Cardiff University
- Stark DJ, Vaughan IP, Saldivar DAR, et al (2017) Evaluating methods for estimating home ranges using GPS collars: A comparison using proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*). *PLoS One* 12:1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174891>
- Takemoto H (2003) Phytochemical determination for leaf food choice by wild chimpanzees in Guinea, Bossou. *J Chem Ecol* 29:2551–2573. <https://doi.org/10.1023/A:1026366119705>
- Thiry V, Stark DJ, Goossens B, et al (2016) Use and selection of sleeping sites by proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*, along the Kinabatangan River, Sabah, Malaysia. *Folia Primatol* 87:180–196. <https://doi.org/10.1159/000449219>
- Yeager CP (1989) Feeding ecology of the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Int J Primatol* 10:497–530
- Yeager CP, Silver SC, Dierenfeld ES (1997) Mineral and phytochemical influences on foliage selection by the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Am J Primatol* 41:117–128
- Zhao H, Wang X, Kreigenhofer B, et al (2013) Study on the nutritional ecology of wild primates. *Acta Ecol Sin* 33:185–191. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2013.05.004>

6 Dispersion des graines par *Nasalis larvatus*



Dans les chapitres précédents, nous avons dévoilé la composition du régime alimentaire de *Nasalis larvatus*, ses variations saisonnières, ainsi que la valeur nutritive des aliments consommés. A présent, nous nous intéressons aux graines retrouvées intactes dans les fèces de *N. larvatus*. Nous y présentons les résultats des tests de germination effectués avec des graines déféquées par les nasiques. En nous concentrant sur le genre *Nauclea*, nous soulignons l'influence positive du nasique sur la germination des graines de *Nauclea* spp., principalement à l'ombre. Nous concluons ce chapitre en insistant sur le rôle, jusqu'ici sous-estimé, que joue le nasique dans la dispersion des graines de certaines espèces de plantes.

Ce chapitre correspond à un article publié :

Thiry V., Bhasin O., Stark D.J., Beudels-Jamar R.C., Vercauteren Drubbel R., Nathan S.K.S.S., Goossens B. and Vercauteren M. (2019) Seed dispersal by proboscis monkeys: the case of *Nauclea* spp. *Primates*, 60 : 449–457. DOI: 10.1007/s10329-019-00736-x

Seed dispersal by proboscis monkeys: the case of *Nauclea* spp.

Authors:

Valentine Thiry^{1,2,†,*}, Oriana Bhasin^{1,†}, Danica J. Stark^{3,4}, Roseline C. Beudels-Jamar², Régine Vercauteren Drubbel¹, Senthilvel K. S. S. Nathan⁵, Benoit Goossens^{3,4,5,6}, Martine Vercauteren¹

¹Anthropology and Human Genetics Unit, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

²Conservation Biology Unit, O.D. Nature, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels, Belgium;

³Danau Girang Field Centre, c/o Sabah Wildlife Department, Kota Kinabalu, Malaysia;

⁴Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Sir Martin Evans Building, Cardiff, UK;

⁵Sabah Wildlife Department, Kota Kinabalu, Malaysia;

⁶Sustainable Places Research Institute, Cardiff University, Cardiff, UK 

* Corresponding author

Valentine Thiry: valentinethiry89@gmail.com , 0032473563831

[†]These authors contributed equally to this study

6.1 Abstract

Frugivorous vertebrates, such as primates, are important dispersal agents in tropical forests, although the role of folivorous colobines is generally not considered. However, recent studies reported seed dispersal by endo- and epizoochory in colobine primates, including the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*), suggesting the role colobines play in seed dispersal might have been underestimated. In the Lower Kinabatangan Floodplain, in Sabah, Malaysian Borneo, we investigated whether seeds were still able to germinate after being ingested by proboscis monkeys. Faecal samples ($n = 201$) from proboscis monkeys were collected between 2015 and 2017. Intact seeds belonging to eight plant species were found in 77% of the faecal samples. *Nauclea* spp. was the most abundant plant species, accounting for 98% of all intact seeds. This study is the first to conduct germination trials on seeds defecated by proboscis monkeys. Higher germination success was recorded in ingested *Nauclea* spp. seeds than in control seeds, from both ripe and unripe *Nauclea orientalis* fruits ($P < 0.001$). Therefore, we suggest that proboscis monkeys play a role in seed dispersal, by enhancing the germination success of defecated seeds, for at least some plant species. Similar to other colobines, although proboscis monkeys may provide a lower contribution to seed dispersal (low seed diversity over short distances) than other sympatric frugivores, this study emphasises that proboscis monkeys do contribute to the dispersal of intact seeds, such as *Nauclea* spp., in potentially suitable riverine habitats.

Keywords:

Nauclea spp., *Nasalis larvatus*, proboscis monkey, seed dispersal, seed germination

6.2 Introduction

Many plant species across the globe rely on animals to disperse their seeds (Farwig and Berens 2012). In tropical forests, up to 98% of plant species bear fruits and require vertebrates, such as birds or mammals, for the dispersal of their seeds (Howe & Smallwood, 1982; Terborgh *et al.*, 2002). Largely because they represent a considerable proportion of the frugivore biomass in tropical forests, primates have long been considered as seed dispersers (Chapman, 1995). When consuming fruits, primates can handle the seeds differently: feeding on the pulp and dropping or spitting out seeds; swallowing and defecating intact seeds (endozoochory); or chewing and destroying seeds (Corlett & Lucas, 1990). Recent studies highlighted the important role many primate species play in seed dispersal (Razafindratsima *et al.*, 2018), mostly by swallowing or dropping the seeds (Albert *et al.*, 2013). However, some primate taxa, such as Asian and African colobines, were generally not included and were considered more as seed predators (Norconk *et al.*, 1998), destroying most of the seeds they consumed (Garber & Lambert, 1998; Norconk *et al.*, 1998). However, primate seed predators can be involved in seed dispersal by swallowing small seeds intact without masticating them, by removing pericarp and seed-coat before discarding seeds (Norconk *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 2012), or by seeds attaching to the animal's fur and dropping off in a different location (epizoochory) (Chen *et al.*, 2018). Indeed, the dichotomy seed predator versus seed disperser has been oversimplified (Norconk *et al.*, 1998) and many primates play a number of roles, depending on the plant consumed (McConkey, 2018).

In colobines, seed dispersal has been recorded in five species, via endozoochory (*Nasalis larvatus* (Matsuda *et al.*, 2013a), *Trachypithecus francoisi hatinhensis* (Nguyen *et al.*, 2013), *T. auratus* (Tsuji *et al.*, 2017) and *Presbytis* sp. (McConkey unpubl. in McConkey 2018)) and via epizoochory (*Rhinopithecus roxellana* (Chen *et al.*, 2018)). Even though seed germination trials were not conducted (Matsuda *et al.*, 2013a; Nguyen *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018) or dispersed seeds showed low germination success (Tsuji *et al.*, 2017), authors suggested that the role colobines play in seed dispersal might have been underestimated. In regard to the wide distribution and biomass of Asian and African colobines, colobine primates might play a considerable role in seed dispersal of some plant species (Matsuda *et al.*, 2013a; Corlett, 2017; Tsuji *et al.*, 2017).

Proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) is an endangered colobine primate endemic to the island of Borneo, where the species inhabits riverine, swamp and mangrove forests (Meijaard *et al.*, 2008). In riverine forest, proboscis monkey home range averages 81 ha (Stark *et al.*, 2017b) and the mean daily distance travelled is 940 m (Stark, 2018). Proboscis monkeys highly use areas close to rivers, select sleeping sites along water and avoid sleeping at the same location on consecutive nights (Stark, 2018). Similar to other colobines, proboscis monkeys have a large sacculated forestomach wherein food fermentation occurs (Nijboer & Clauss, 2006), and therefore, they usually avoid feeding on ripe fleshy fruits which are rich in sugar susceptible to ferment in gas, and therefore, can be deleterious for their digestive system (Waterman & Kool, 1994). Proboscis monkeys mostly consume young leaves, unripe

fruits and seeds (Matsuda *et al.*, 2009b) and display long gut retention times (mean retention times (MRTs) of 40 hours (Matsuda *et al.*, 2015)).

The role of proboscis monkeys as seed dispersers has previously been suggested, based on the presence of intact seeds in 11% of monkey analysed faeces (Matsuda *et al.*, 2013a). However, until now, no known germination tests have been conducted to determine how the ingestion of seeds by proboscis monkeys would affect seed germination. We focused on seed dispersal by endozoochory and aimed to investigate whether seeds were still able to germinate after being ingested by proboscis monkeys. We predicted that (1) small intact seeds would be found in proboscis monkey faeces, as reported by Matsuda *et al.* (2013a) and because small seeds might be less damaged by mastication and pass intact through the animal gut (Corlett & Lucas, 1990; Norconk *et al.*, 1998), and (2) due to their feeding habits (preferring unripe fruits over ripe fruits), the seeds defecated by proboscis monkeys would experience lower germination rates than control seeds (collected directly from fruits), such as reported in the colobine Javan lutung (*T. auratus*) (Tsuji *et al.*, 2017).

6.3 Methods

6.3.1 Study site

This study took place over 14 months between May to August 2015, January to May 2016, and November 2016 to March 2017, in Lots 5, 6, and 7 of the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary (LKWS, 5°10'-05°50'N, 117°40'-118°30'E), Sabah, Malaysian Borneo (Figure 46). The major forest types in the LKWS include dry lowland forests, semi-inundated and permanent swamps, and mangrove forests (Abram *et al.*, 2014). Forest vegetation is dominated by *Dillenia excelsa*, *Mallotus muticus*, *Colona serratifolia*, *Antidesma puncticulatum* and *Vitex pinnata* tree species. The five most abundant vine species are *Lophopyxis maingayi*, *Entada rheedii*, *Bridelia stipularis*, *Dalbergia stipulacea* and *Croton triqueter* (6.25 ha botanic plot survey, Thiry unpubl.). Daily temperatures and rainfall were measured at the research station. During the study, mean monthly rainfall was 177 ($\pm$ SD = 121) mm. Mean minimum and maximum temperatures were 24.5 ($\pm$ SD = 0.7) and 30.4 ($\pm$ SD = 1.8)°C, respectively.

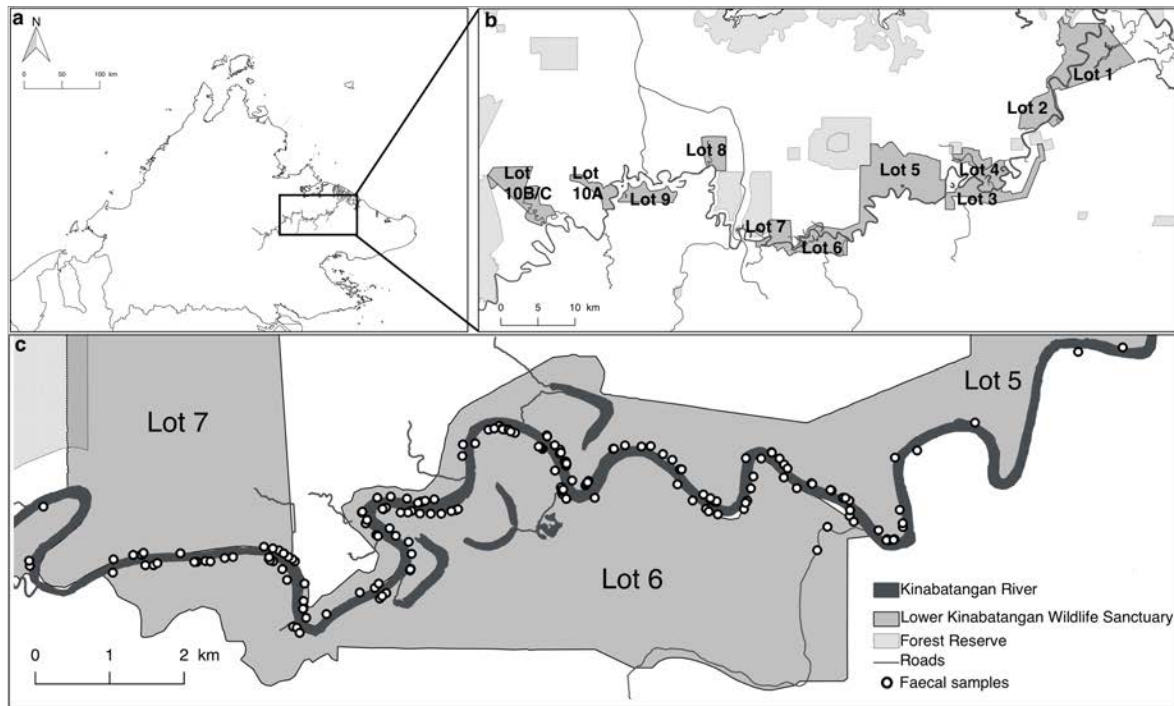


Figure 46. Maps of the study area: a the State of Sabah in Malaysian Borneo with the location of the Kinabatangan River; b the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary, with its 10 protected forest lots (dark grey) and the Forest Reserve (light grey); c zoom on the study site in lots 5, 6 and 7, with faecal sampling locations

6.3.2 Faecal sampling

In riverine habitats, proboscis monkeys generally spend their nights in trees along riverbanks (Matsuda *et al.*, 2011b). We conducted boat-based surveys in the late afternoon to look for proboscis monkeys along the Kinabatangan River. To avoid sampling the same group multiple times within the same month, we searched for proboscis monkey groups along different sections of a pre-established 21 km river transect in a month. We selected the first proboscis monkey group that we found and conducted behavioural observations until dark (instantaneous scan and ad libitum sampling). The following morning, we returned to the same trees where the group was located the previous evening and continued our observations on the same group. This allowed us to ascertain that no other diurnal primate species (long-tailed and pig-tailed macaques (*Macaca fascicularis* and *M. nemestrina*); silvered, maroon and Hose's langurs (*Trachypithecus cristatus*, *Presbytis rubicunda* and *P. hosei*); Bornean gibbons (*Hylobates muelleri*) and Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*)) spent the night in or neighbouring (within 10 m) proboscis monkeys' sleeping trees. In the morning, once the proboscis monkeys had left the riverside, we approached the bank to search for fresh faecal samples under the sleeping trees. Although some faeces might have fallen in the water when a sleeping tree canopy was overhanging the river, we were still able to find faecal samples most (if not all) mornings. Proboscis monkey faeces were easily identifiable, generally properly shaped and soft (Nijboer, 2006) and spread out on leaves, on the

forest ground or on the river bank. One single large faecal sample assumed to belong to an adult individual was collected per group and stored in an empty Falcon tube until analysis. An extra sample was collected to supply faecal matter in germination trial experiments (see treatment F2 below). When sympatric primates were within 10 m of the group, we did not collect faecal samples. During the study, we collected a total of 201 proboscis monkey faecal samples (mean $\pm$ SD = 14 ± 6 faeces month⁻¹). Most faeces sampled within the same month were considered to belong to distinct proboscis monkey groups that ranged in different areas along the study transect.

6.3.3 Faecal analysis

Within four hours of collection, the sample was weighed and cleaned with water using a 0.4 mm mesh strainer until all faecal matter was removed (Trolliet *et al.*, 2016). Using a stereoscope, intact seeds were extracted and grouped according to their shape, size and colour, and the exact numbers of intact seeds were counted. Finally, ingested seeds were identified by comparing them to a pre-established seed reference collection, containing seeds from identified fruit species found in the study area. When identification was not possible on site, seeds were sent to the Forest Research Centre (Sandakan, Sabah) to be identified by botanical experts.

6.3.4 Germination trials

6.3.4.1 Preliminary germination trials

For each seed species found intact in proboscis monkey faeces, cleaned seeds (F1) were placed in Petri dishes (maximum 16 seeds / Petri dish) filled with filter paper (Serio-Silva and Rico-Gray 2003). Filter paper was chosen for the ease to visualise small seeds. Petri dishes were placed outside at ambient temperature and in continuous shade for 60 days. Seeds were checked every four days and germination event was defined as the emergence of the radicle (Trolliet *et al.*, 2016).

6.3.4.2 Advanced germination trials: *Nauclea* spp.

As *Nauclea* spp. seeds were found in abundance in proboscis monkey faeces, further germination trials were conducted, considering different seed treatments. To assess the effect of proboscis monkey gut passage on *Nauclea* spp. seed germination, we conducted experiments to compare the germination of ingested seeds and control seeds from fruits. *Nauclea orientalis* and *N. subdita* trees are present throughout the study site, however the seeds are morphologically indistinguishable: the fruits are brown with an irregular globular shape and contain thousands of tiny ovoid seeds measuring 1 mm long (Lim, 2013). Even though fruits from both species are consumed by proboscis monkeys (Matsuda *et al.*, 2009b; Thiry unpubl.), fruit-feeding behaviour in the current study was mostly on *N. orientalis* (88% of feeding occurrences recorded at the riverside by scan sampling method). Therefore, seeds from *N. orientalis* fruits were used as experimental controls.

Based on Samuels and Levey (2005), we investigated five different treatments, which included the effect of being discarded from fruit pulp (manually extracted seeds from *N. orientalis* unripe (FR1) and ripe fruits (FR2) vs. seeds from ripe fruits with fleshy pulp (FR3)); and the chemical/mechanical effect of being ingested by proboscis monkeys (gut passed seeds, without (F1) or with (F2) faecal matter vs. manually extracted seeds (FR1 and FR2)) (Table 14). We considered two treatments for gut passed seeds to better represent natural conditions, F1 consists of defecated seeds that are freed from faecal matter (i.e., after secondary seed dispersal by dung beetles, or heavy rain washing the faecal matter away) and F2 where seeds lay inside faecal clumps.

Table 14. Categories (gut passed and control) and treatments (F1, F2, FR1, FR2 and FR3) of *Nauclea* spp. and *N. orientalis* seeds used during germination trials, set up in Petri dishes filled with forest soil.

Seed categories and treatments	Seed code in survival analyses
Gut passed seeds: <i>Nauclea</i> spp.	
F1: without faecal matter (n = 109)	F (n = 201)
F2: with faecal matter (n = 92)	
Control seeds: <i>N. orientalis</i>	
FR1: from unripe fruit (n = 104)	UF (n = 104)
FR2: from ripe fruit without pulp (n = 75)	RF (n = 153)
FR3: from ripe fruit with pulp (n = 78)	

* n = number of seeds per treatment.

Petri dishes were filled with forest soil (depth: 0.5 – 1 cm) and 16 *Nauclea* seeds of the same treatment (F1, F2, FR1, FR2 or FR3) were deposited on the soil surface of each dish. All Petri dishes were placed outside at ambient temperature and in continuous shade for 60 days (Trolliet *et al.*, 2016) and subsequently the Petri dishes were moved into direct sunlight for 20 more days (i.e., sun conditions) (Hodgkison *et al.*, 2003). We checked the seeds and added water every four days. To investigate the effect of the five treatments on *Nauclea* spp. seed germination, we conducted survival analyses (McNair *et al.*, 2012) by measuring initial germination delay (the time it took for the first seed to germinate), germination speed (how many seeds germinated within four days) and total percentage of seeds that germinated at the end of the experiment (McNair *et al.*, 2012). Survival analyses were only performed for *Nauclea* spp. (see below), as sample sizes of other seed species were too small.

6.3.5 Statistical analyses

6.3.5.1 Advanced germination trials: *Nauclea* spp.

Analyses were conducted with R (version 3.4.3) with a statistical significance of $P < 0.05$ (R Development Core Team, 2017). We performed time-to-event analyses (survival analysis) on *Nauclea* spp. germination data (McNair *et al.*, 2012), using the *survival* package (Therneau, 2015) to fit Kaplan-

Meier survival functions. Survival curves were then plotted using the *survimer* package (Kassambara *et al.*, 2017). Finally, log-rank tests were performed to assess the homogeneity of multiple survivor functions and to conduct pair-wise comparisons of different seed treatments (McNair *et al.*, 2012).

6.4 Results

A high proportion (77.1%) of the analysed faecal samples (155 out of the 201) contained intact seeds, with seeds being recorded each month of the study. There were 28,452 intact seeds from at least eight different plant species found in 77.1% of the faecal samples (Table 15). All species were small-seeded, with most seeds measuring less than 2 mm in length, except for *Antidesma puncticulatum* (2-5 mm), Unknown sp. B (2-5 mm) and *Bridelia stipularis* (5-8 mm). The number of seeds ranged from 0 to 2,408 per sample, with an average of 141 ± 262 seeds per sample. Accounting for 98% of all intact seeds and found in 70.1% of the faecal samples, *Nauclea* spp. were the most abundant seed species, followed by an unidentified species (Unknown sp. A, recorded in 14.4% of faeces). Other species were observed less frequently, on average in $3.2 \pm 2.3\%$ of the faeces (Table 15). Chewed (broken) seeds were not considered: due to the small seed size we would not have been able to distinguish or identify them.

Table 15. List of intact seeds recorded in proboscis monkey faeces (n = 155) collected between 2015 and 2017

Intact seeds (family and species)		Number of faecal samples containing intact seeds	Range of number of seeds per faecal sample	Seed length (mm)
Moraceae	<i>Ficus racemosa</i>	15	1 - 23	< 2
Moraceae	<i>Ficus septica</i>	8	1 - 21	< 2
Phyllanthaceae	<i>Antidesma puncticulatum</i>	3	2 - 7	2 - 5
Phyllanthaceae	<i>Bridelia stipularis</i>	5	1 - 12	5 - 8
Rubiaceae	<i>Nauclea</i> spp.	141	1 – 2408	< 2
Unknown	Unknown sp. A	29	1 - 120	< 2
Unknown	Unknown sp. B	2	1 - 4	2 - 5
Unknown	Unknown spp. ⁱ	6	1 - 55	NA

* Unknown spp. refers to a combination of several indistinguishable seeds, different from Unknown sp. A and B.

6.4.1 Germination trials

6.4.1.1 Preliminary germination tests

Seeds of six plant species germinated after passing through the gut of proboscis monkeys (Table 16, no germination tests could be conducted with *A. puncticulatum* and Unknown spp.).

Table 16. Germination fate of intact seeds after ingestion by proboscis monkeys.

Seed species	Yes	No	NA	Total
<i>Bridelia stipularis</i>	1	0	35	36
<i>Ficus racemosa</i>	19	43	0	62
<i>Ficus septica</i>	8	0	0	8
<i>Nauclea</i> spp.	114	53	8	175
Unknown sp.A	12	46	5	63
Unknown sp.B	1	0	2	3

* NA refers to failure occurring during germination experiments (i.e., insect damage, humidity conditions, etc.)

6.4.1.2 Advanced germination tests: *Nauclea* spp.

For reasons of clarity, different seed treatments were grouped when homogeneity tests were not significantly different and did not influence differently the fate of tested seeds. F is the combination of the treatments F1 and F2 (Log Rank: $\chi^2 = 0$, df = 1, $P = 0.993$), RF is the combination of FR2 and FR3 (Log Rank: $\chi^2 = 0.3$, df = 1, $P = 0.592$) and UF refers to FR1 (Table 14).

Homogeneity tests showed that the different treatments influenced the fate of seeds exposed to shade and sun conditions (Log Rank: $\chi^2 = 79.5$, df = 2, $P < 0.001$). We observed that ingested seeds (F) had a higher probability of germination (day 80: 87% of seeds had germinated) than control seeds from unripe fruits (UF) (Log Rank: $\chi^2 = 29$, df = 1, $P < 0.001$; day 80: 76%) and ripe fruits (RF) (Log Rank: $\chi^2 = 63$, df = 1, $P < 0.001$; day 80: 69%). Moreover, we observed that UF seeds had a higher percentage of germination than RF seeds (Log Rank: $\chi^2 = 6.3$, df = 1, $P < 0.05$). Finally, ingested seeds (F) showed a shorter initial germination delay (mean $\pm$ SD: 46 ± 21 d) than RF (65 ± 15 d) and UF (65 ± 11 d) seeds, as well as an increased germination speed (at day 60: 108 F seeds had already germinated, as opposed to only 10 RF and 7 UF seeds) (Figure 47).

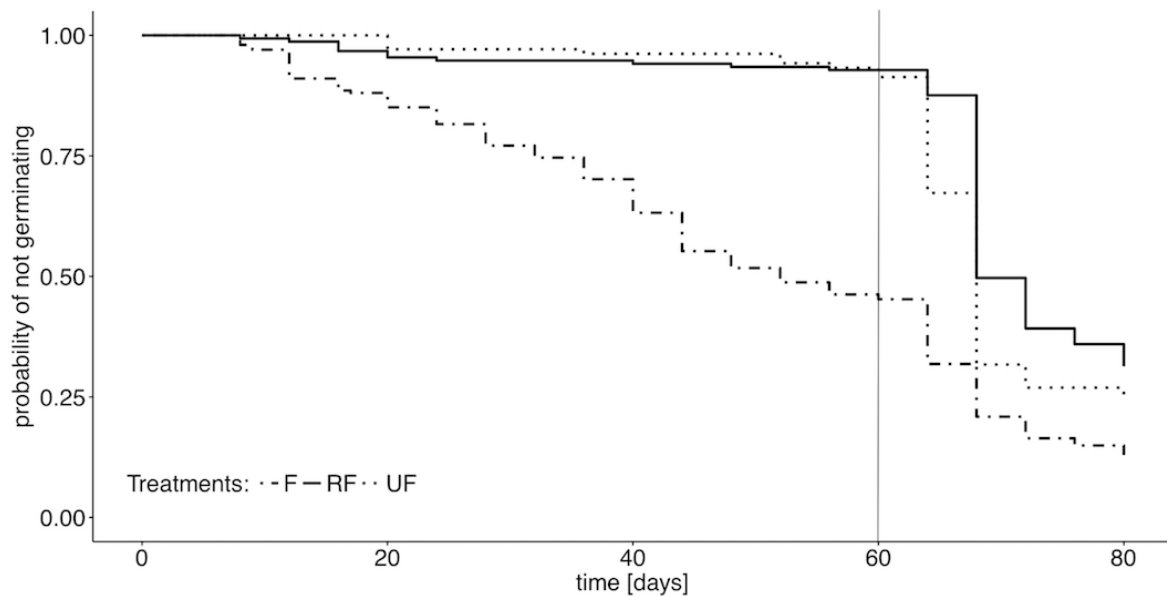


Figure 47. Germination curves of seeds growing under shade conditions (60 d) followed by sun exposure (20 d) for three treatments; F = *Nauclea* spp. seeds ingested by proboscis monkeys (n = 201), RF = seeds from ripe *N. orientalis* fruits (n = 153), and UF = seeds from unripe *N. orientalis* fruits (n = 104); Each dip in the survival curve represents a germination event.

6.5 Discussion

Our study demonstrated that proboscis monkeys do play a role in seed dispersal. We recorded the presence of intact seeds in their faeces each month, with 77.1% of analysed faecal samples containing seeds. As proboscis monkeys avoid ripe fruits and select unripe fruits (Matsuda *et al.*, 2009b), we suggest the small intact seeds are from unripe fruits. Our results contrast with previous studies that reported a low presence (only 11% of faeces in three months out of a 13-month study) (Matsuda *et al.*, 2013a) or an absence of seeds in proboscis monkey faeces entirely (Ranglack and Yeager 1986). Moreover, our study reported higher seed diversity (eight species) in comparison to Matsuda *et al.* (2013a), who identified seeds belonging to only three plant species (*Ficus globosa*, *Antidesma thwaitesianum* and *N. subdita*). We reported similar densities of *Ficus* and *A. puncticulatum* (the updated name for *A. thwaitesianum*) seeds in proboscis monkey faeces (1 - 23 and 2 - 7 seeds per sample, respectively) as Matsuda *et al.* (2013a) in Sukau, a study site located 30 km downstream from ours. However, we recorded remarkably higher densities of *Nauclea* spp. seeds (1-2,408 seeds per faecal sample) in comparison to the low *N. subdita* seed densities reported in Sukau (1-23 seeds per sample) (Matsuda *et al.*, 2013a). Finally, we recorded *Bridelia stipularis* seeds in five faecal samples, while Matsuda *et al.* (2013a) did not. The observed disparities in seed species diversity, density and monthly presence in proboscis monkey faeces between both studies might be the result of differences in plant (fruit) composition and availabilities. High numbers of plant species are reported in both study sites (n=180 in Matsuda *et al.* (2009b), and n=201 in this study). However, as vegetation survey methods

differed between studies (trail transects (Matsuda *et al.* 2009b) and botanic plots (Thiry unpubl.)), plant availabilities are difficult to compare. Results more probably differ between studies because the methods used to examine the content of faecal samples were different. Indeed, in Matsuda *et al.* (2013a), faecal samples were analysed manually with forceps and a magnifying glass, without draining faecal matter away, and this method may have missed seeds, while our approach with a strainer may be more appropriate to record the presence of small seeds. Although proboscis monkeys are also known as seed predators (e.g., consumed seeds of the unripe *Ficus binnendijkii* fruit were never found in faeces) (Matsuda *et al.*, 2013a), we did not monitor proboscis monkeys the whole day, and therefore were not able to record whether other consumed seeds were absent from their faeces (i.e., chewed seeds).

Even though the role of proboscis monkeys in seed dispersal has previously been suggested (Matsuda *et al.*, 2013a), the present study is the first to detail the germination of seeds ingested by this colobine species. We found that six of the eight seed species examined were able to germinate after passage through the gut of proboscis monkeys. While statistical tests could not be performed on the germination data of five of the seed species, survival analyses conducted with the most abundant small-seeded species, *Nauclea* spp., indicated that seeds ingested by proboscis monkeys exhibit higher germination success (87%) than seeds from control fruits (both ripe and unripe). This result differs from a previous study on another colobine, the Javan lutung (*T. auratus*), where lower germination success (only 5%) was observed in defecated *Ficus* spp. seeds than in control seeds (10%), suggesting that lutungs are not efficient fig dispersers (Tsuji *et al.*, 2017). In our study, differences are particularly striking under shade conditions (first 60 days) where the seeds ingested by proboscis monkeys started to germinate earlier and faster than the seeds extracted from fruits: at d 60, 54% of ingested seeds had already germinated, as opposed to only 7% of the control seeds (from ripe and unripe fruits). A possible explanation for this germination pattern could be that seeds ingestion increases seed-coat permeability and enhances gas exchange and water absorption (Barnea *et al.*, 1990). Pulp removal is also reported to be beneficial, as fruit flesh may inhibit germination (Evenari, 1949), although we did not observe any difference between FR2 and FR3 treatments (control seeds without and with pulp). Additionally, faecal matter surrounding ingested seeds has been suggested to have a fertilising effect and to promote seedling growth (Traveset *et al.*, 2001). On the other hand, faecal matter may promote fungal and/or bacterial growth, that could in turn prevent seedling establishment (Meyer & Witmet, 1998). The presence of faecal matter appeared to be neutral in our study, as F1 and F2 treatments (ingested seeds without and with faecal matter, respectively) did not differ significantly.

We observed that UF seeds (control seeds from unripe fruits) had a higher probability of germination than RF seeds (control seeds from ripe fruits) by the end of the germination experiment (d 80: 60 days of shade followed by 20 days of sun exposure). Although counterintuitive (Arthur, 1985), higher or similar germination success of seeds from unripe fruits, compare with mature fruits, has been reported (Foster, 1977; Arditti *et al.*, 1981; Cruz-Tejada *et al.*, 2018). In the case of *N. orientalis* (used for control treatments), this could be an advantage to benefit from seed dispersal by animals that

preferentially feed on unripe fruits, such as colobines (Davies *et al.*, 1988; Dasilva, 1994; Matsuda *et al.*, 2009b; Hanya & Bernard, 2012; Ehlers Smith *et al.*, 2013).

Seed density has been reported to negatively affect germination success (Barnea *et al.*, 1992). Therefore, when high density of seeds are found in faecal samples, such as in our present study, intra- and interspecific competition may occur between seeds, affecting seedling survival and establishment (Loiselle, 1990; Traveset *et al.*, 2007). However, being consumed by frugivores might still benefit plant species bearing multi-seeded fruits, such as *Nauclea* or *Ficus* species. Indeed, faecal clumps may contain lower seed densities than the multi-seeded fruit itself, reducing seed competition and potentially enhancing germination (Barnea *et al.*, 1992).

The presence of *N. orientalis* seeds has already been recorded in the faeces of another colobine primate, the Javan lutung (*T. auratus*) in Indonesia (Tsuji *et al.*, 2017). In our study site, silvered langurs (*T. cristatus*) are also known to consume *N. orientalis* fruits. Colobines are not the only mammals consuming *N. orientalis* fruits, as other frugivores, such as the Bornean bearded pig (*Sus barbatus*), large flying fox (*Pteropus vampyrus*), long-tailed macaque or Bornean orangutan, also feed on these fruits, underlying the potential existence of a wide community of *N. orientalis* dispersers (Bhasin, unpubl.). The relative contribution of colobines to seed dispersal may be lower than that of other sympatric frugivorous animals (i.e., macaques, gibbons, hornbills, etc.), mostly as they disperse low diversity of seeds over short distances (Tsuji *et al.*, 2017; McConkey, 2018). However, in regard to the wide distribution and large biomass of colobines in Asian and African forests (Matsuda *et al.*, 2013a), they could potentially be important seed dispersers for some plant species. Moreover, as colobines mostly target unripe fruits and disperse seeds over shorter distances (i.e., < 100 m in Javan lutung (Tsuji *et al.*, 2017)), we believe they can provide a complementary service to other frugivores (i.e., gibbons) consuming ripe fruits and dispersing seeds over longer distances (i.e., up to 1.3 km in gibbon (McConkey, 2018)). As *N. orientalis* naturally occurs along riverbanks (Azmi, 1998; Boland *et al.*, 2006), we suggest that riverine seed deposition by proboscis monkeys is suitable for *Nauclea* spp. In addition, as proboscis monkey sleeping trees are often located along water (Stark, 2018), secondary seed dispersal might also occur by hydrochory: when branches overhang the river, proboscis monkey faeces may fall in the water, float away until reaching a bank and potentially establish seedlings in a distant suitable riverine habitat. *N. orientalis* seed dispersal by water has already been reported along the Ord River in Australia (Pettit & Froend, 2001). These results suggest that *N. orientalis* has more than one dispersal mechanism (polychory).

It is of interest to note that we often recorded large numbers of faecal samples under proboscis monkey sleeping trees, which may attract a vast guild of secondary seed dispersers (e.g., dung beetles) (Shepherd & Chapman, 1998) or seed predators (e.g., rodents) (Andresen & Levey, 2004). Although faecal samples were collected shortly after being defecated, dung beetles were often already observed in proboscis monkey faeces. Therefore, further research should investigate the post-dispersal fate of proboscis monkey dispersed-seeds.

To conclude, our study emphasises that the role proboscis monkeys play in seed dispersal has been underestimated thus far. Proboscis monkeys should be considered as seed dispersers, at least of some plant species. First, they prefer to feed on unripe fruits over young leaves during certain times of the year (Matsuda *et al.*, 2009b). They then defecate large numbers of tiny intact seeds, which can improve the germination success of some plant species, such as those of *Nauclea* spp. And finally, in regard to their long MRTs (Matsuda *et al.*, 2015), daily ranging movements and sleeping site selection close to rivers (Stark, 2018), we suggest that proboscis monkeys contribute to the dispersal of intact seeds, away from the parent plant, in potentially suitable riverine habitats.

Acknowledgments

We are grateful to the Sabah Biodiversity Centre and the Sabah Wildlife Department for supporting our research project and allowing us to conduct this study in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary. This project would not have been possible without financial support from the FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique), the FNRS Gustave Boël-Sofina Fellowship and the Fonds Léopold III – pour l’Exploration et la Conservation de la Nature asbl. We thank Quentin Philipps for his precious contribution, as well as all the students and research assistants at Danau Girang Field Centre who worked with us in the field. Finally, we thank the two anonymous reviewers for their valuable comments that improved the manuscript.

Funding

This study was funded by FNRS (2014 – 18100, 2016 - 16755), FNRS Gustave Boël-Sofina Fellowship (2016) and Fonds Léopold III – pour l’Exploration et la Conservation de la Nature asbl. (2014 - 14.118).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

No direct contacts with animals were conducted during this research and ethical aspects of the research protocols have been approved by the FNRS committee and Sabah Biodiversity Council.

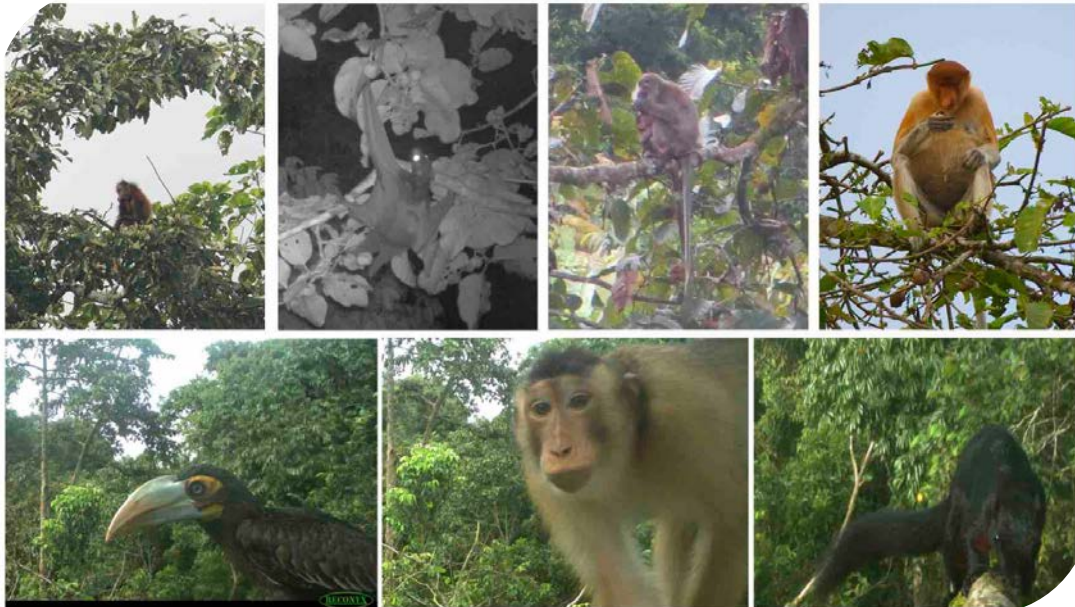
References

- Abram NK, Xos P, Tzanopoulos J, Macmillan DC, Ancrenaz M, Chung R, Peter L, Ong R, Lackman I, Goossens B, Ambu L, Knight AT (2014) Synergies for improving oil palm production and forest conservation in floodplain landscapes. *PLoS One* 9:e95388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095388>
- Albert A, Hambuckers A, Culot L, Savini T, Huynen MC (2013) Frugivory and seed dispersal by Northern pigtailed macaques (*Macaca leonina*), in Thailand. *Int J Primatol* 34:170–193
- Andresen E, Levey DJ (2004) Effects of dung and seed size on secondary dispersal, seed predation, and seedling establishment of rain forest trees. *Oecologia* 139:45–54
- Arditti J, Michaud JD, Allison PO (1981) Seed germination of North American orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia*, and *Platanthera*. *Bot Gaz* 142:442–453
- Arthur JC (1985) Deviation in development due to the use of unripe seeds. *Am Nat* 29:804–815
- Azmi R (1998) Natural vegetation of the Kinabatangan Floodplain. Part 1: an introduction to its natural vegetation, including a preliminary plant checklist of the region. WWF-Malaysia, Kota Kinabalu
- Barnea A, Yom-Tov Y, Friedman J (1990) Differential germination of two closely related species of *Solanum* in response to bird ingestion. *Oikos* 57:222–228
- Barnea A, Yom-Tov Y, Friedman J (1992) Effect of frugivorous birds on seed dispersal and germination of multi-seeded fruits. *Acta Oecol* 13:209–219
- Barnett AA, Boyle SA, Pinto LP, Lourenc WC, Almeida T, Silva WS, Ronchi-Teles B, Bezerra BM, Ross C, MacLarnon A, Spironello WR (2012) Primary seed dispersal by three Neotropical seed-predating primates (*Cacajao melanocephalus ouakary*, *Chiropotes chiropotes* and *Chiropotes albinasus*). *J Trop Ecol* 28:543–555
- Boland DJ, Brooker MIH, Chippendale GM, Hall N, Hyland BPM, Johnston RD, Kleinig DA, McDonald MW, Turner JD (2006) Forest trees of Australia, 5th edn. CSIRO Publishing, Collingwood
- Chapman CA (1995) Primate seed dispersal: coevolution and conservation implications. *Evol Anthropol* 4:74–82
- Chen Y, Chen H, Zhang Y, Yao H, Yang W, Zhao Y, Ruan X, Xiang Z (2018) First evidence of epizoochorous seed dispersal by golden snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) in temperate forest. *Plant Ecol* 219:417–427
- Corlett RT (2017) Frugivory and seed dispersal by vertebrates in tropical and subtropical Asia: an update. *Glob Ecol Conserv* 11:1–22
- Corlett RT, Lucas PW (1990) Alternative seed-handling strategies in primates: seed-spitting by long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Oecologia* 82:166–171
- Cruz-Tejada DM, Acosta-Rojas DC, Stevenson PR (2018) Are seeds able to germinate before fruit color ripening? Evidence from six Neotropical bird-dispersed plant species. *Ecosphere* 9:e02174. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2174>
- Dasilva GL (1994) Diet of *Colobus polykomos* on Tiwai Island: selection of food in relation to its seasonal abundance and nutritional quality. *Int J Primatol* 15:655–680
- Davies AG, Bennett EL, Waterman PG (1988) Food selection by two South-east Asian colobine monkeys (*Presbytis rubicunda* and *Presbytis melalophos*) in relation to plant chemistry. *Biol J Linn Soc* 34:33–56
- Ehlers Smith DA, Husson SJ, Ehlers Smith YC, Harrison ME (2013) Feeding ecology of red langurs in Sabangau tropical peat-swamp forest, Indonesian Borneo: extreme granivory in a non-masting forest. *Am J Primatol* 9999:1–12
- Evenari M (1949) Germination inhibitors. *Bot Rev* 15:153–194
- Farwig N, Berens DG (2012) Imagine a world without seed dispersers: a review of threats, consequences and future directions. *Basic Appl Ecol* 13:109–115
- Foster MS (1977) Ecological and nutritional effects of food scarcity on a tropical frugivorous bird and its fruit source. *Ecology* 58:73–85
- Garber PA, Lambert JE (1998) Primates as seed dispersers: ecological processes and directions for future research. *Am J Primatol* 45:3–8
- Hanya G, Bernard H (2012) Fallback foods of red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*) in Danum Valley, Borneo. *Int J Primatol* 33:322–337
- Hodgkison R, Balding ST, Zubaid A, Kunz TH (2003) Fruit bats (Chiroptera: Pteropodidae) as seed dispersers and pollinators in a lowland Malaysian rain forest. *Biotropica* 35:491–502
- Howe HE, Smallwood J (1982) Ecology of seed dispersal. *Annu Rev Ecol Syst* 13:201–228
- Kassambara A, Kosinski M, Biecek P, Fabian S (2017) Package ‘survminer’: drawing survival curves using ‘ggplot2’. R package version 0.4.1. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>

- Lim TK (2013) Edible medicinal and non-medicinal plants: fruits, vol 5. Springer, New York
- Loiselle BA (1990) Seeds in droppings of tropical fruit-eating birds: importance of considering seed composition. *Oecologia* 82:494–500
- Matsuda I, Tuuga A, Higashi S (2009) The feeding ecology and activity budget of proboscis monkeys. *Am J Primatol* 71:478–492
- Matsuda I, Tuuga A, Bernard H (2011) Riverine refuging by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) and sympatric primates: implications for adaptive benefits of the riverine habitat. *Mamm Biol* 76:165–171
- Matsuda I, Higashi S, Otani Y, Tuuga A, Bernard H, Corlett RT (2013) A short note on seed dispersal by colobines: the case of the proboscis monkey. *Integr Zool* 8:395–399
- Matsuda I, Sha JCM, Ortmann S, Schwarm A, Grandl F, Caton J, Jens W, Kreuzer M, Marlena D, Hagen KB, Clauss M (2015) Excretion patterns of solute and different-sized particle passage markers in foregut-fermenting proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) do not indicate an adaptation for rumination. *Physiol Behav* 149:45–52
- McConkey KR (2018) Seed dispersal by primates in Asian habitats: from species, to communities, to conservation. *Int J Primatol* 39:466–492
- McNair JN, Sunkara A, Frobish D (2012) How to analyse seed germination data using statistical time-to-event analysis: non-parametric and semi-parametric methods. *Seed Sci Res* 22:77–95
- Meijaard E, Nijman V, Supriatna J (2008) *Nasalis larvatus*. The IUCN red list of threatened species 2008: e.T14352A4434312. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T14352A4434312.en>. Downloaded on 23 July 2019
- Meyer GA, Witmet MC (1998) Influence of seed processing by frugivorous birds on germination success of three North American shrubs. *Am Midl Nat* 140:129–139
- Nguyen H, Bai B, Li N, Pan Y, Lu (2013) Fruit diet, selectivity and seed dispersal of Hatinh langur (*Tachypithecus francoisi hatin-hensis*). *Acta Ecol Sin* 33:110–119
- Nijboer J (2006) Fibre intake and faeces quality in leaf-eating pri- mates. Dissertation, Universiteit Utrecht
- Nijboer J, Clauss M (2006) The digestive physiology of colobine primates. In: Nijboer J (ed) Fibre intake and faeces quality in leaf-eating primates. Universiteit Utrecht, Utrecht, pp 9–28
- Norconk MA, Grafton BW, Conklin-Brittain NL (1998) Seed dispersal by neotropical seed predators. *Am J Primatol* 45:103–126
- Pettit NE, Froend RH (2001) Availability of seed for recruitment of riparian vegetation: a comparison of a tropical and a temperate river ecosystem in Australia. *Aust J Bot* 49:515–528
- Ranglack G, Yeager C (1986) Survey of intestinal parasites found in proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) and long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Primate Rep* 14:249
- Razandratsima OH, Sato H, Tsuji Y, Culot L (2018) Advances and frontiers in primate seed dispersal. *Int J Primatol* 39:315–320
- R Development Core Team (2017) R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. R 3.4.3. Vienna
- Samuels IA, Levey DJ (2005) Effects of gut passage on seed germination: do experiments answer the questions they ask? *Funct Ecol* 19:365–368
- Serio-Silva J, Rico-Gray V (2003) Howler monkeys (*Alouatta palliata mexicana*) as seed dispersers of strangler gs in disturbed and preserved habitat in Southern Veracruz, Mexico. In: Marsh LK (ed) Primates in fragments: ecology and conservation. Springer, Boston, pp 267–281
- Shepherd VE, Chapman CA (1998) Dung beetles as secondary seed dispersers: impact on seed predation and germination. *J Trop Ecol* 14:199–215
- Stark DJ (2018) Habitat use and movement of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in a degraded and human-modified forest landscape. PhD Thesis, Cardiff University
- Stark DJ, Vaughan IP, Saldivar DAR, Nathan SKSS, Goossens B (2017) Evaluating methods for estimating home ranges using GPS collars: a comparison using proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*). *PLoS One* 12:1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174891>
- Terborgh J, Pitman N, Silman M, Schichter H, Núñez VP (2002) Main- tenance of tree diversity in tropical forests. In: Levey DJ, Silva WR, Galetti M (eds) Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation. CAB International, Wallingford, pp 1–17
- Therneau TM (2015) A package for survival analysis in S. version 2.38. <https://CRAN.R-project.org/package=survival>
- Traveset A, Bermejo T, Willson M (2001) Effect of manure composi- tion on seedling emergence and growth of two common shrub species of Southeast Alaska. *Plant Ecol* 155:29–34

- Traveset A, Robertson AW, Rodríguez-Pérez J (2007) A review on the role of endozoochory in seed germination. In: Dennis AJ, Schupp EW, Green RJ, Westcott DA (eds) Seed dispersal: theory and its application in a changing world. CAB International, Wallingford, pp 78–103
- Trolliet F, Serckx A, Forget P, Beudels-Jamar RC, Huynen MC, Ham-buckers A (2016) Ecosystem services provided by a large endan-gered primate in a forest-savanna mosaic landscape. *Biol Conserv* 203:55–66
- Tsuji Y, Ningsih JIDP, Kitamura S, Widayati KA, Suryobroto B (2017) Neglected seed dispersers: endozoochory by Javan lutungs (*Trachypithecus auratus*) in Indonesia. *Biotropica* 49:539–545
- Waterman PG, Kool KM (1994) Colobine food selection and plant chemistry. In: Davies AG, Oates JF (eds) Colobine monkeys: their ecology, behaviour, and evolution. Cambridge University Press, Cambridge, pp 251–284

7 Interactions entre la communauté animale et *Nauclea orientalis*



Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que les nasiques jouent un rôle dans la dispersion des graines de certaines espèces de plantes, comme *Nauclea* spp. Nous y soulignons d'ailleurs la potentielle complémentarité des services écologiques fournis par les colobinés et les autres primates dans le *LKWS*. Ici, nous nous intéressons davantage à l'espèce d'arbre *Nauclea orientalis*, fortement consommée par les nasiques dans notre site étude (Chapitre 3) et dont les fruits furent utilisés pour les traitements contrôles lors des tests de germination (Chapitre 6). A l'aide d'observations directes et de *camera traps*, nous illustrons la vaste communauté animale (mammifères et oiseaux) qui dépend de *N. orientalis* pour s'abriter et/ou se nourrir le long du fleuve Kinabatangan. Finalement, nous attirons l'attention sur l'intérêt des recherches qui étudient les interactions animaux-plantes, à l'échelle du paysage, notamment dans des paysages fragmentés, tels que le *LKWS*.

Ce chapitre est adapté d'un article en préparation :

Bhasin O., Thiry V., Stark D.J., Vercauteren Drubbel R., Nathan S.K.S.S., Goossens B., Vercauteren M. **(in prep.)** Interactions between animal species and *Nauclea orientalis* trees along the Kinabatangan River.

Interactions between animal species and *Nauclea orientalis* trees along the Kinabatangan River

Short title:

Animals interacting with *Nauclea orientalis*.

Authors :

Oriana Bhasin ^{1*}, Valentine Thiry ^{1,2}, Danica J. Stark ^{3,4}, Régine Vercauteren Drubbel ¹, Senthilvel K. S. S. Nathan ⁵, Benoît Goossens ^{3,4,5,6}, Martine Vercauteren ¹

¹ Anthropology and Human Genetics Unit, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium;

² Conservation Biology Unit, Education and Nature, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels, Belgium;

³ Danau Girang Field Centre, c/o Sabah Wildlife Department, Wisma Muis, 88100 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia;

⁴ Organisms and Environment Division, Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff CF10 3AX, UK;

⁵ Sabah Wildlife Department, Wisma Muis, 88100 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia;

⁶ Sustainable Places Research Institute, Cardiff University, 33 Park Place, Cardiff CF10 3BA, UK

*** Corresponding author**

Oriana Bhasin

oriana.bhasin@gmail.com (OB), +32 478 29 84 12

7.1 Abstract

Context. Understanding plant-animal interactions, especially complex multispecies networks, can provide useful information for conservation planning and reforestation program in tropical floodplains.

Aims. This study aimed to highlight the interactions existing between the animal community and an abundant tree species, *Nauclea orientalis*, along the Kinabatangan River by using two different observation methods.

Methods. Trees were monitored by conducting boat-based surveys as well as setting up ground and canopy camera traps from November 2016 to March 2017 in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary, Sabah.

Key Results. In total, 31 bird and 14 mammal species were observed interacting with *N. orientalis*. Birds were mostly observed perching, while several mammals were observed resting in and feeding on the leaves and fruits of *N. orientalis*. The study sheds light on the vertical distribution of the most common animal species interacting with *N. orientalis*, as well as on the diel variation of their presence in trees. Both direct observations and camera traps had advantages and disadvantages in terms of species detection, cost and effort. However, both observation methods revealed complementary information and thus, their combined use is recommended for further research in similar study sites.

Implications. This study provides a more comprehensive understanding of which animal species rely on *N. orientalis* for food and/or shelter. This fundamental knowledge of community composition is crucial for further studies aiming to understand processes underlying plant-animal interactions and trying to reveal the resilience of these networks to deforestation and fragmentation.

Keywords

Plant-animal interactions; *Nauclea orientalis*; Frugivory; Borneo; Camera trapping; Primates

7.2 Introduction

Over time, plants and animals have evolved in relation to selective pressures created by their physical environment and their interactions with other organisms. These interactions can significantly influence an organisms' behaviour, morphology and ecology (Abrahamson, 1989). Plant-animal interactions also influence evolution, structure and dynamics of ecological communities (Abrahamson, 1989; Kanowski *et al.*, 2004). They generally form complex multiple species networks, as each plant species often interacts with multiple animal species (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2017). Moreover, interactions are context-dependent, changing over time and space (Abrahamson, 1989).

Given the current context of rapid deforestation occurring on the island of Borneo (Kettle *et al.*, 2011; Bryan *et al.*, 2013), it is crucial to assess the risk and vulnerability of the biodiversity to fragmentation in order to develop mitigation strategies (Tewksbury *et al.*, 2002; Howe, 2016). To this end, understanding how plant-animal interactions influence ecological communities is essential to help design and implement forest management and restoration plans (Kanowski *et al.*, 2004).

Numerous observation techniques are available to monitor and inventory biodiversity but some techniques are more adapted to particular types of studies, ecosystems or species (Silveira *et al.*, 2003). Conducting direct observation along a transect is usually an affordable method, but is weather dependent, time-consuming and requires a lot of rigor and consistency (Peres, 1999; Silveira *et al.*, 2003). More recently, the use of camera traps is becoming widespread in wildlife studies as it can easily generate large amounts of data (Di Cerbo & Biancardi, 2012). Camera traps have proven to be very effective for studying terrestrial animals, although using camera traps in the canopy for the study of arboreal animals is a still recently developing technique (Gregory *et al.*, 2014). The high initial cost of this camera trapping is rapidly amortized by the low maintenance and human effort needed (Silveira *et al.*, 2003; Di Cerbo & Biancardi, 2012), however, they appear to be more sensitive and often have high false trigger rates (e.g. caused by moving vegetation or insects), particularly for cameras placed in the canopy (Gregory *et al.*, 2014).

The current study focuses on the interactions between *Nauclea orientalis* (L.) and the animal community inhabiting the forest along the Kinabatangan River. *N. orientalis* is a sub-canopy tree belonging to the Rubiaceae family that can grow up to 30 m (Orwa *et al.*, 2009). It is distributed throughout Sri Lanka and Southeast Asia to New Guinea and North-Eastern Australia (Lim, 2013). Several animal species have already been reported interacting with *N. orientalis* in some of these areas. Philippine giant fruit bats (*Pteropus vampyrus lanensis*) and golden-crowned flying-foxes (*Acerodon jubatus*) have been observed eating its flowers and/or fruits (Mildenstein *et al.*, 2005). Fruit consumption was also reported among white-handed gibbons (*Hylobates lar*) (Kanwatanakid-Savini *et al.*, 2009). In Australia, intact seeds were found in faeces of cassowaries (*Casuarius casuarius*) (Stocker & Irvine, 1983). Furthermore, recent studies reported seed dispersal of *N. orientalis* by Northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*) (Albert *et al.*, 2013) and Javan lutungs (*Trachypithecus auratus*) (Tsuji *et*

al., 2017). In Borneo, finally, sightings of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) using *N. orientalis* as sleeping trees (Thiry et al., 2016) and feeding on *N. orientalis* (Matsuda, Tuuga, & Higashi, 2009) have already been reported.

In this study, we investigated how animals interact with *N. orientalis*, by identifying the type of interaction observed (e.g., feeding, sheltering, moving, etc.), the variation of animal presence in *N. orientalis* during the day, and the vertical distribution of animals in the tree. Finally, we discussed the efficiency of using both data collection methods (direct observations along transects or camera traps) to address our research objectives.

7.3 Materials and methods

7.3.1 Study site and abiotic conditions

This study took place from December 2016 to March 2017 in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary (LKWS, 5°24'48.23" N, 118°2'17.94" E), in the state of Sabah, Malaysian Borneo. This 27,000 ha sanctuary was gazetted in 2005 and includes a variety of habitats such as riparian forests, seasonally flooded forests, swamp forests, dry dipterocarp forests, estuary nipa palms and mangroves (Estes et al. 2012). During the study period, the minimum and maximum temperatures averaged respectively 24.1°C ($\pm$ SD= 0.6) and 29.0°C ($\pm$ SD=1.5) and the total rainfall was 1200 mm.

7.3.2 Description of *N. orientalis*

This tree is usually described as a pioneer species (Orwa *et al.*, 2009; Raffa, 2014), preferring alluvial soils along rivers, streams and beaches (Boland *et al.*, 2006). The globular, wrinkled and irregularly shaped fruits are green when unripe and turn to yellow-brown when they are ripe (Orwa *et al.*, 2009). The fruits are 3-5 cm in diameter and contain thousands of small seeds, which are bilaterally compressed, ovoid to ellipsoid in shape, and 1-2 x 1 mm in size (Lim, 2013).

7.3.3 Animal interactions with *N. orientalis*

To identify which animal species interacted with *N. orientalis* trees, we conducted direct observations during boat-based surveys and set up camera traps in *N. orientalis* trees. Both methods were carried out along a pre-established eight-km transect of the Kinabatangan River.

7.3.4 Direct observations of animals interacting with *N. orientalis*

Between January and March 2017, boat-based surveys were conducted by two trained observers according to Peres (1999) guidelines along the eight-km transect and during different time periods: early morning (6am-8am), morning (8am-10am, 10am-12pm), afternoon (12pm-2pm, 2pm-4pm), late

afternoon (4pm-6pm) and night (8pm-10pm). Boat-based surveys were conducted once per month for each time slots, upstream and downstream along the transect, and were repeated every month. During each survey, we used binoculars to look for animals interacting with *N. orientalis*. Once an animal was observed in a *N. orientalis* tree, we recorded the variables listed in Table 17.

Table 17. Information recorded during direct observation sessions along river transect when animals interacted with *N. orientalis* tree.

Variable	Description
Animal species	Identification in situ or at the research station
Position in the tree	Low, low-middle, middle, middle-top, top *
Behaviour	Feeding (folivory and frugivory), resting, perching, moving
Interaction type	Mutualism (+/+), commensalism (+/0), antagonism (+/-)

* Low = $\leq 5\text{m}$; low-middle = 6-10m; middle = 11-15m; middle-top = 16-20m; top = $> 20\text{m}$.

7.3.5 Camera traps

Six canopy camera traps (CT) (Reconyx HyperFire PC800 and HC500) protected in metal cases (Reconyx HyperFire Security Enclosure) were installed at the middle to top height of the tree (11-15 m) once to twice a month from December 2016 to March 2017 (Table 18). In order to record interactions of terrestrial animals with *N. orientalis*, five ground level CTs were also set up in March 2017. Default camera settings (Motion sensor: on; sensitivity: high; pictures per trigger: 3; picture interval: 1s; quiet period: no; resolution: 1080p; night mode: balanced; temperature: °C) were used and SD cards and batteries were replaced approximately every two weeks. Cameras kept recording for at least a week and up to 1.5 month. We recorded date, time, animal species, animal location (on a tree branch, on the ground), and if feeding was observed. The six canopy CTs were periodically moved between 12 sites (Figure 48), located both on the north (6 sites) and south riverbanks (6 sites), and split along the transect in order to cover all sections of the study site. Two canopy CTs were set up in each tree, except for four of them (sites 2, 4, 5 and 14) with only one camera trap installed. The five ground-level CTs were periodically moved between 3 sites along the south riverbank (Figure 48). For canopy CTs, the camera was attached along the main trunk in the canopy, and the focal point of the camera lens was pointed in the direction of a horizontal branch of *N. orientalis* which had a lot of fruits. The ground-level CTs were directed towards an open area or animal trail with fallen *N. orientalis* fruits.

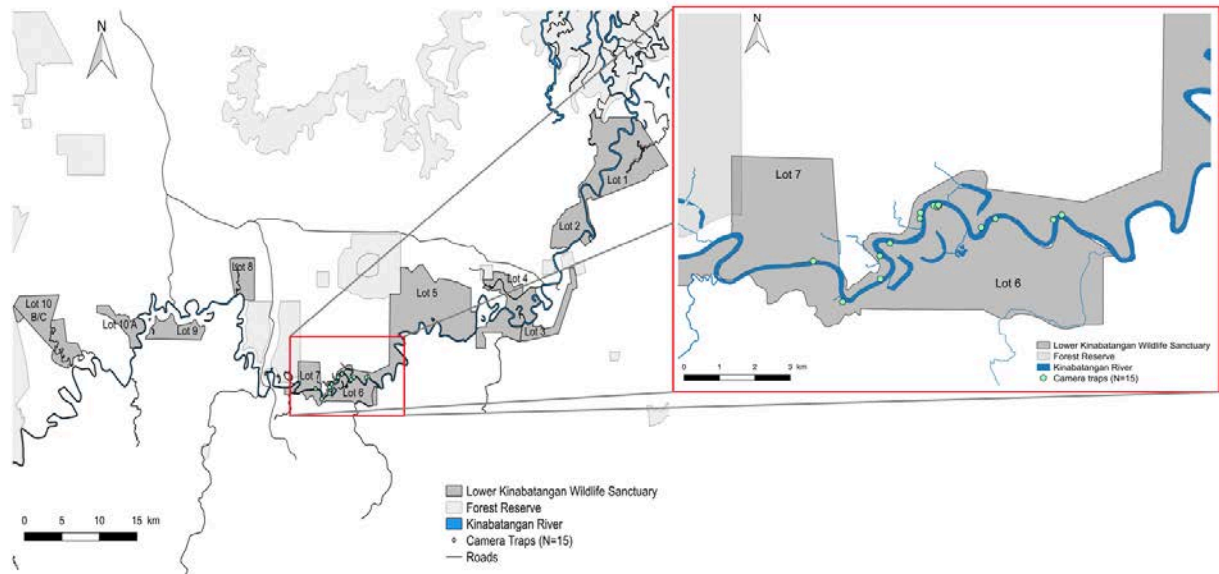


Figure 48. Position of the canopy and the ground-level camera traps (green circles) along the eight-km river transect surveyed to identify interactions between *N. orientalis* and the animal community.

Table 18. Ground level and canopy camera trap survey details and active camera trap-days (CT-Days).

Camera traps			
Placement	Site n°	Number of CT	CT-Days
Canopy	1	2	38
	2	1	23
	3	2	41
	4	1	19
	5	1	15
	6	2	29
	7	2	30
	8	2	29
	9	2	29
	10	2	25
	11	2	25
	12	2	25
Ground level	13	2	14
	14	1	21
	15	2	7

7.3.6 Statistical analysis

As all variables did not follow a normal distribution, non-parametrical tests were performed. The probability of encountering some of the most common animal species ($N_{\text{observations}} > 10$) in *N. orientalis*, given animals' position in trees and the time of the day, was predicted using multinomial logistic regression on the data collected by direct observations. This classification method was chosen

since our dependent variable (different animal species) was discrete (Arabatzis & Gregoire, 1991). To show the difference of activity between diurnal and nocturnal species, diurnal animals sleeping at night and nocturnal animals sleeping during the day were not included in this analysis. The effect of factors (time of day and position in tree) on the model was evaluated by running a type-III ANOVA (Fox & Weisberg, 2011). Two time slots were grouped together for the morning (8am-10am, 10am-12pm) and afternoon (12pm-2pm, 2pm-4pm) categories, as preliminary results showed that there were not many animal sightings during these time periods (pers. obs.). Finally, a post-hoc analysis was performed using the Tukey HSD test to compare each factor in the model (Singmann *et al.*, 2017). All statistical analyses were run in R 3.4.0 (2017), with a 95% confidence interval.

7.4 Results

7.4.1 Observation of plant-animal interactions

In total, 3,554 min of boat-based observations were conducted and sessions lasted 86 min (± 22 min) on average. Canopy CTs kept recording between 15 and 41 days (total trapping nights = 328) and ground level CTs kept recording between 7 and 21 days (total trapping nights = 42). Four camera traps set up in three different trees did not record any animals because of battery or triggering problems. Canopy CTs took 113,258 pictures and animals were present in 6.8% of them while ground level CTs took 4,591 pictures and animals were present in 64.4% of them.

In this study, 31 bird species belonging to 11 different orders were observed interacting with *N. orientalis* (Table 19). More than half of these species are currently declining in the wild, including two species listed as Endangered, the wrinkled hornbill (*Rhabdotorrhinus corrugatus*) and the storm's stork (*Ciconia stormi*), and one Critically Endangered species, the straw-headed bulbul (*Pycnonotus zeylanicus*) (IUCN, 2019). All the bird species recorded were considered diurnal apart from three nocturnal owl species. In total, 29 bird species were recorded by direct observations, compared to four species detected by camera traps. Nine bird species, such as the Storm's stork (*Ciconia stormi*), the green imperial pigeon (*Ducula aenea*) and the Malaysian blue flycatcher (*Cyornis turcosus*), were only observed once by direct observations. In contrast, bushy-crested hornbills (*Anorrhinus galeritus*) and the olive-backed sunbird (*Cinnyris jugularis*) were only captured by camera traps. Buffy fish owls (*Ketupa ketupu*), great egrets (*Ardea alba*) and oriental pied hornbills (*Anthracoceros albirostris*) were the most common species encountered during our direct observations. Finally, all bird species listed were observed perching in *N. orientalis*, although black-and-red broadbills (*Cymbirhynchus macrorhynchos*) were also observed nesting in partially submerged trees.

Table 19. Bird species (Class Aves) interacting with *N. orientalis*, with the number of times they were observed by both detection techniques (CT = camera traps, DO = direct observations).

Order	Common name	Species	CT	DO	IUCN status*
Accipitriformes	Lesser fish eagle	<i>Icthyophaga humilis</i>	-	2	NT
Accipitriformes	Grey-headed fish eagle	<i>Icthyophaga ichthyaetus</i>	-	2	NT
Accipitriformes	White-bellied sea eagle	<i>Haliaeetus leucogaster</i>	-	4	LC
Accipitriformes	Wallace's hawk-eagle	<i>Nisaetus nanus</i>	-	3	VU
Accipitriformes	Crested serpent eagle	<i>Spilornis cheela</i>	-	7	LC
Bucerotiformes	Bushy-crowned hornbill	<i>Anorrhinus galeritus</i>	2	-	LC
Bucerotiformes	Oriental pied hornbill	<i>Anthraceroceros albirostris</i>	1	13	LC
Bucerotiformes	Wrinkled hornbill	<i>Rhabdotorrhinus corrugatus</i>	2	2	EN
Ciconiiformes	Storm's stork	<i>Ciconia stormi</i>	-	1	EN
Columbiformes	Green imperial pigeon	<i>Ducula aenea</i>	-	1	LC
Coraciiformes	Blue-eared kingfisher	<i>Alcedo meninting</i>	-	1	LC
Coraciiformes	Blue-throated bee-eater	<i>Merops viridis</i>	-	3	LC
Coraciiformes	Stork-billed kingfisher	<i>Pelargopsis capensis</i>	-	9	LC
Cuculiformes	Greater coucal	<i>Centropus sinensis</i>	-	6	LC
Passeriformes	Olive-backed sunbird	<i>Cinnyris jugularis</i>	1	-	LC
Passeriformes	Black-and-red broadbill	<i>Cymbirhynchus macrorhynchos</i>	-	5	LC
Passeriformes	Malaysian blue flycatcher	<i>Cyornis turcosus</i>	-	1	NT
Passeriformes	Barn swallow	<i>Hirundo rustica</i>	-	2	LC
Passeriformes	Yellow-vented bulbul	<i>Pycnonotus goiavier</i>	-	2	LC
Passeriformes	Straw-headed bulbul	<i>Pycnonotus zeylanicus</i>	-	2	CR
Passeriformes	Malaysian pied fantail	<i>Rhipidura javanica</i>	-	1	LC
Pelecaniformes	Great white egret	<i>Ardea alba</i>	-	19	LC
Pelecaniformes	Purple heron	<i>Ardea purpurea</i>	-	2	LC
Pelecaniformes	Little egret	<i>Egretta garzetta</i>	-	2	LC
Pelecaniformes	Intermediate egret	<i>Ardea intermedia</i>	-	7	LC
Piciformes	Barbet	-	-	1	-
Strigiformes	Owl	-	-	1	-
Strigiformes	Buffy fish owl	<i>Ketupa ketupu</i>	-	21	LC
Strigiformes	Brown wood owl	<i>Strix leptogrammica</i>	-	1	LC
Suliformes	Oriental darter	<i>Anhinga melanogaster</i>	-	2	NT
Unknown bird	-	-	-	1	-

* Species IUCN status (IUCN, 2019) with LC = Least Concern; NT = Near Threatened; VU = Vulnerable; EN = Endangered; CR = Critically Endangered.

Fourteen mammal species belonging to six different orders were recorded interacting with *N. orientalis*. Ten of these species are currently decreasing in the wild, including two species listed as Endangered, the Bornean gibbon (*Hylobates muelleri*) and the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*),

and one species listed as Critically Endangered, the Bornean orangutan (*Pongo pygmaeus*) (IUCN, 2019) (Table 20). Among the mammals, 11 species are considered diurnal, while large flying foxes (*Pteropus vampyrus*) and common palm civets (*Paradoxurus hermaphroditus*) are considered nocturnal. The lesser mouse deer (*Tragulus kanchil*), on the other hand, is considered as a crepuscular species (early morning and late afternoon) (Ross *et al.*, 2013). We recorded 10 species by direct observations, and nine species were detected by camera traps. Combining both techniques, long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*), proboscis monkeys and large flying foxes were the most common mammal species encountered. All mammal species listed below were observed resting and/or moving in *N. orientalis*, although some of them were also observed feeding on these trees. Fruit consumption was reported for Bornean bearded pig (*Sus barbatus*), lesser mouse deer (*Tragulus kanchil*), large flying fox, long-tailed macaque, Bornean orangutan, silvered langur (*Trachypithecus cristatus*), and Prevost's squirrel (*Callosciurus prevostii*). Proboscis monkeys were observed feeding on both *N. orientalis* leaves and fruits.

Table 20. Mammal species interacting with *N. orientalis*, with the number of times they were observed by both detection techniques (CT = camera traps, DO = direct observations).

Order	Common name	Species	CT	DO	IUCN status*
Artiodactyla	Bornean bearded pig	<i>Sus barbatus</i>	6	-	VU
Artiodactyla	Lesser mouse-deer	<i>Tragulus kanchil</i>	5	-	LC
Carnivora	Common palm civet	<i>Paradoxurus hermaphroditus</i>	-	2	LC
Chiroptera	Large flying fox	<i>Pteropus vampyrus</i>	3	21	NT
Primates	Bornean orangutan	<i>Pongo pygmaeus</i>	-	2	CR
Primates	Long-tailed macaque	<i>Macaca fascicularis</i>	306	96	LC
Primates	Bornean gibbon	<i>Hylobates muelleri</i>	-	1	EN
Primates	Proboscis monkey	<i>Nasalis larvatus</i>	36	45	EN
Primates	Silvered langur	<i>Trachypithecus cristatus</i>	3	16	NT
Primates	Southern pig-tailed macaque	<i>Macaca nemestrina</i>	3	-	VU
Rodentia	Plantain squirrel	<i>Callosciurus notatus</i>	3	-	LC
Rodentia	Prevost's squirrel	<i>Callosciurus prevostii</i>	3	2	LC
Rodentia	Tree mouse	<i>Chiropodomys</i> sp.	-	2	-
Scandentia	Tree shrew	-	-	2	-

* Species IUCN status (IUCN, 2019) with LC = Least Concern; NT = Near Threatened; VU = Vulnerable; EN = Endangered; CR = Critically Endangered

7.4.2 Animal diel activity pattern and vertical distribution in *N. orientalis*

As we observed 39 animal species by direct observation compared to 13 using camera traps, we used data collected from the first method to identify the activity pattern and the vertical distribution of

the most common nocturnal and diurnal birds and mammals (N>10 observations) in *N. orientalis* (Figure 49).

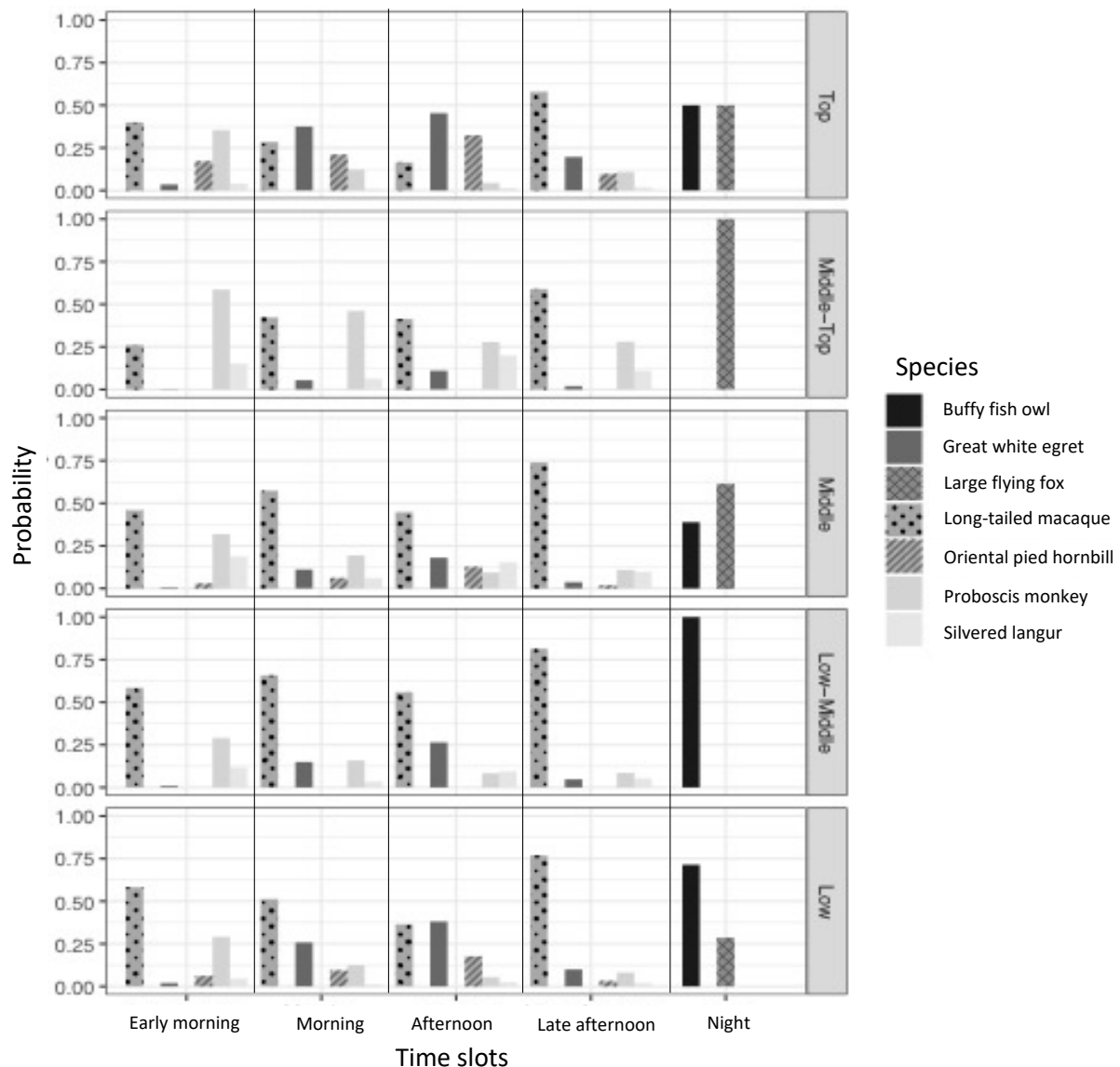


Figure 49. Probability of encountering different animal species in *N. orientalis*, given their position in trees and detection time. Sleeping animals were not included.

Animal species were encountered with significantly different probabilities in *N. orientalis* ($p < 0.001$), regarding their position in trees and the time of the day. P-values correspond to the probability of observing an animal species in *N. orientalis* at a certain height and at a certain time of the day in comparison to the other animal species interacting with this tree. In late afternoon, long-tailed macaques dominated low, low-middle and middle heights and probabilities to encounter any of the other animal species at these heights were significantly lower ($p < 0.001$). There was a high probability to encounter long-tailed macaques in higher tree positions in late afternoon. However, the probability that the long-tailed macaques would be the only species present in late afternoon was no longer significant

($p=0.25$), as proboscis monkeys also used middle-top height, while great white egrets were present on top of *N. orientalis* trees as well. In contrast, during the night, the low-middle height was significantly dominated by buffy fish owls ($p<0.001$) and middle-top height was significantly dominated by large flying foxes ($p<0.001$).

7.5 Discussion

7.5.1 Evaluation of camera traps and direct observation methods

Animal species interacting with *N. orientalis* were observed using direct observations and camera traps. Both techniques had advantages and disadvantages. A large majority of bird species were only recorded using direct observations while similar numbers of mammal species were detected by the two methods. Only a minority of animal observations were made between 10am and 4pm (DO = 17.1%; CT = 37.7%), suggesting that diurnal animals were less active in *N. orientalis* and along the riverbank around midday (Peres, 1999; Di Cerbo & Biancardi, 2012). Lower activity levels during this part of the day have been suggested as a response to higher temperatures (Hambali *et al.*, 2012; Oliveira-Santos *et al.*, 2013), such as found along sun-exposed riverbanks. Primates, for instance, are known to move away from riverbanks before the heat of midday which could explain why less activity was observed along the riverbank after 10am and before 4pm (Peres, 1991).

Camera traps were a valuable tool for detecting small animals (plantain squirrels, Prevost's squirrels and olive-backed sunbird) or terrestrial mammals (lesser mouse deer) that were more difficult to detect from the boat. Another advantage of camera traps was the continuous (24-hour) monitoring of animals in comparison to the short sampling periods of direct observations (Di Cerbo & Biancardi, 2012). This feature is useful to study the diel activity pattern and the distribution of animals in *N. orientalis*, especially since this aspect of the ecology of flying and non-flying arboreal animals remains poorly understood (Graipel *et al.*, 2003). However, study of animal vertical distribution in *N. orientalis* was limited for canopy camera traps, as they were set up at pre-determined heights (middle-top). In fact, as flying and non-flying arboreal animals co-occur throughout the canopy, studies suggest that they will use niche dimensions differently in order to co-exist in the same tree (Cameron *et al.*, 1979; Ricklefs, 2008). For example, it has been shown that the differential use of both habitat and plant item consumption includes strategies of resource partitioning (Leite *et al.*, 2013; Oliveira-Santos *et al.*, 2013). Therefore, it appears that the monitoring design of interactions between animals and *N. orientalis* using camera traps did not encompass species that preferentially used different heights of the same tree. As *N. orientalis* trees are numerous along the riverbanks, the number of camera traps set up might have been insufficient to properly monitor elusive arboreal and terrestrial species. Consequently, increasing the number of camera traps deployed along the river as well as setting-up camera traps at different tree heights is recommended for future studies. Moreover, although camera traps are considered as non-invasive tools, studies have reported that they are occasionally noticed by animals (Schipper, 2007;

Oliveira-Santos *et al.*, 2013; Gregory *et al.*, 2014; Meek *et al.*, 2016). We observed, for instance, that bushy-crested, oriental pied, wrinkled hornbills, long-tailed and pig-tailed macaques looked at and moved towards the cameras, which could create a bias in the diel variation of their presence by monopolizing the space in front of cameras longer than they usually would. However, camera traps were less time-consuming and more cost-effective than direct observations since we only needed to maintain them twice a month. In terms of camera trap setup, a higher false trigger rate in canopy camera traps (animal presence in only 6.8% of the pictures) as compared to ground level cameras (64.4%) is likely due to more interfering factors in the canopy, including leaf movement, high humidity, and insect infestation (Gregory *et al.*, 2014).

Monitoring plant-animal interactions using direct observations was very efficient in the current study, in particular for birds, as 93.5% of all birds recorded were observed at least once using this method. This may be due to the behaviour of the birds, such as the speed at which smaller birds move, resulting in them moving out of the camera's field of view before the camera can take a picture, and therefore may also cause what looks like false triggers. Our camera trap sampling design might also have been a limiting factor: canopy camera traps were only set up at middle-top height, a position that birds did not tend to use except for hornbills and birds that were small enough to fly through the trees' large horizontal branches. Large flying foxes were also recorded more often using direct observations than with camera traps. The reason for this could be simply related to their ecology and behaviour (Kunz & Jones, 2000). Several aspects of their feeding behaviour can complicate the determination of appropriate locations to set up canopy camera traps. For example, large flying foxes usually leave their roost site in silent and loose groups of individuals and are even capable of flying up to 50 km to reach their feeding site (Medway 1969; Kunz and Jones 2000a). Monitoring large number of trees by direct observation has, however, shown to be more efficient in this study.

Overall, the greater animal diversity observed using direct observations most likely resulted from the abundance and widespread distribution of *N. orientalis* along the Kinabatangan River portion that we surveyed. Two sightings of the Critically Endangered Bornean orangutan and one sighting of the Endangered Bornean gibbon (IUCN, 2019) in *N. orientalis* were even made possible using this technique. The direct observation method, however, was more weather dependent and time-consuming than the camera trap method, and was also less ecologically responsible and less cost-efficient since the transects were conducted by motorboat and needed replicates.

7.5.2 Animal diel activity pattern and distribution in *N. orientalis*

Studies suggest that animal community structure could be driven by spatial and temporal processes, such as their diel activity pattern and their distribution in trees (Cameron *et al.*, 1979; Ricklefs, 2008). We found that primates were more likely to be encountered in early morning and late afternoon. However, we suggest that the loose spatial and temporal distribution pattern of long-tailed

macaques could be related to their semi-terrestrial behaviour and their large group size (Sussman & Tattersall, 1981). In contrast, proboscis monkey activity in *N. orientalis* peaked in early morning and took place in the upper part of the tree. This part of the tree crown has been previously described as proboscis monkeys preferred positions at sleeping sites (Thiry *et al.*, 2016), and especially when they feed (Boonratana, 2003; Mawah *et al.*, 2015). At night, large flying foxes and buffy fish owls were observed interacting with *N. orientalis*. However, they were present at different heights and never in the same tree. Buffy fish owls were more present at low-middle height which is consistent with studies reporting that Strigiformes tend to perch on branches few meters above the ground, as they use a ‘perch and wait’ hunting strategy (Lenton, 1984). In contrast, flying foxes were observed more often at middle-top height, consistent with the fact that they tend to roost and feed preferentially in the upper canopy (Gould, 1978; Kunz & Jones, 2000; Hahn *et al.*, 2014). Silvered langurs and oriental pied hornbills, on the other hand, did not show any specific spatial and temporal preferences, although increased observations may reveal a more accurate pattern of their behaviour.

7.5.3 Conclusions and directions for further research

This study showed that the functional importance of *N. orientalis* is not only limited to landscape engineering with their roots assisting in the stabilization of soil, but also plays a role in the ecology of several animal species by providing food and/or shelter. In terms of data collection methods, both direct observations and camera traps had their pros and cons in terms of species detection, and cost and effort efficiencies. However, in this study along the Kinabatangan River, the two techniques revealed complementary information. The direct observation approach was valuable to assess the diversity of animal species (especially birds) interacting with *N. orientalis*, while camera traps were more useful to record presence of small or terrestrial animals that were less visible from the boat. Therefore, we recommend the combined use of these two observation methods in order to optimize animal species interactions with *N. orientalis*, especially when conducting comparable research at similar study site. Further research investigating interactions between animals and *N. orientalis* should also be conducted over a longer period of time (i.e. 1,000-2,000 trapping nights, Rovero, Zimmermann, Berzi, & Paul, 2013), and should study the phenology of *N. orientalis* in order to monitor seasonal variation in animal species interacting with this species. Improvement of observation methods and especially camera trapping methods, should also be made to encompass more species and decrease the rate of non-target stimulus events. Moreover, the value of using camera traps should consider the fact that some animal species notice them. This bias may need correcting (Meek *et al.*, 2016), and further studies should assess how and to what extent camera traps affect the behaviour of these animal species. The collection and analysis of faecal samples from animal species that feed on *N. orientalis* could help identify the nature of the interaction, for example, whether it is seed predation or seed dispersal. Finally, additional in-depth research on plant-animal interactions should include smaller sized vertebrates, such as amphibians

and reptiles, as well as invertebrates, in order to provide a more complete picture on how species interact with each other.

7.5.4 Implications for conservation

The evaluation of community composition is crucial in order to understand processes underlying plant-animal interactions and to reveal the resilience of these networks to deforestation and fragmentation. This study, therefore, provides a more comprehensive understanding of which animal species rely on *N. orientalis* for food and/or shelter and points out the fact that more than half of these animal species are currently experiencing population declines in the wild. These results also highlight the need for animal conservation and forest restoration efforts to focus on habitat enhancement, considering the complex multispecies networks formed between fauna and flora (Kanowski *et al.*, 2004; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2017). Finally, further studies along the Kinabatangan River should focus on plant-animal interactions, as well as on the network structure and the ecological functions of these interactions, in order to understand how deforestation and fragmentation will affect them (Morris, 2010; Griffiths *et al.*, 2011).

Acknowledgments

We thank the Sabah Wildlife Department and the Sabah Biodiversity Centre for allowing us to conduct this project in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary. We also thank all students and research assistants at Danau Girang Field Centre for their precious help in the field. We thank Houston Zoo and Sime Darby Foundation for their material and financial support. This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of conflicted interests

The Authors declare no conflicts of interest.

References

- Abrahamson WG (1989) Plant-animal interactions: An overview. In: Abrahamson WG (ed) Plant-animal interactions. McGraw Hill, New York, pp 1–22
- Albert A, Hambuckers A, Culot L, et al (2013) Frugivory and seed dispersal by Northern pigtailed macaques (*Macaca leonina*), in Thailand. *Int J Primatol* 34:170–193. <https://doi.org/10.1007/s10764-012-9649-5>
- Arabatzis AA, Gregoire TG (1991) Ordered and unordered multinomial response models: an application to assess loblolly pine merchantability. *Can J For Res* 21:261–268
- Boland DJ, Brooker MIH, Chippendale GM, et al (2006) Forest trees of Australia, 5th edn. CSIRO Publishing, Melbourne
- Boonratana R (2003) Feeding ecology of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in the Lower Kinabatangan, Sabah, Malaysia. *Sabah Park Nat J* 6:1–26
- Bryan JE, Shearman PL, Asner GP, et al (2013) Extreme differences in forest degradation in Borneo: Comparing practices in Sarawak, Sabah, and Brunei. *PLoS One* 8:e69679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069679>
- Cameron GN, Kincaid WB, Carnes BA (1979) Experimental species removal: Temporal activity patterns of *Sigmodon hispidus* and *Reithrodontomys fulvescens*. *J Mammal* 60:195–197
- Di Cerbo AR, Biancardi CM (2012) Monitoring small and arboreal mammals by camera traps: Effectiveness and applications. *Acta Theriol (Warsz)* 58:279–283. <https://doi.org/10.1007/s13364-012-0122-9>
- Fox J, Weisberg S (2011) An {R} companion to applied regression, second edition
- Gould E (1978) Foraging behavior of Malaysian nectar-feeding bats. *Biotropica* 10:184–193
- Graipel M, Miller P, Glock L (2003) Padrão de atividade de Akodon motensis e Oryzomys russatus na Reserva Volta Velha, Santa Catarina, Sul do Brasil. *Mastozool Neotrop* 10:255–260
- Gregory T, Rueda FC, Deichmann J, et al (2014) Arboreal camera trapping: Taking a proven method to new heights. *Methods Ecol Evol* 5:443–451. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12177>
- Griffiths CJ, Hansen DM, Jones CG, et al (2011) Resurrecting extinct interactions with extant substitutes. *Curr Biol* 21:762–765. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.042>
- Hahn MB, Epstein JH, Gurley ES, et al (2014) Roosting behaviour and habitat selection of *Pteropus giganteus* reveal potential links to Nipah virus epidemiology. *J Appl Ecol* 51:376–387. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12212>
- Hambali K, Ismail A, Md-zain BM (2012) Daily activity budget of long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) in Kuala Selangor Nature Park. *Int J Basic Appl Sci* 12:47–52
- Howe HF (2016) Making dispersal syndromes and networks useful in tropical conservation and restoration. *Glob Ecol Conserv* 6:152–178. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.03.002>
- Kanowski J, Catterall CP, Dennis AJ, Westcott DA (2004) Animal-plant interactions in rainforest conservation and restoration. Cooperative Research Centre for Tropical Rainforest Ecology and Management. Rainforest CRC, Cairns
- Kanwatanakid-Savini C on, Poonswad P, Savini T (2009) An assessment of food overlap between gibbons and hornbills. *Raffles Bull Zool* 57:189–198
- Kettle CJ, Ghazoul J, Ashton P, et al (2011) Seeing the fruit for the trees in Borneo. *Conserv Lett* 4:184–191. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00161.x>
- Kunz BTH, Jones DP (2000) *Pteropus vampyrus*. *Mamalian Species* 1–6
- Leite YLR, Costa LP, Stallings JR (2013) Diet and vertical space use of three sympatric opossums in a Brazilian Atlantic forest reserve. *J Trop Ecol* 12:435–440
- Lenton ML (1984) The feeding and breeding ecology of barn owls *Tyto alba* in Peninsular Malaysia. *Ibis (Lond 1859)* 126:551–575
- Lim TK (2013) Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 5, Fruits. Springer, New York
- Matsuda I, Tuuga A, Higashi S (2009) The feeding ecology and activity budget of proboscis monkeys. *Am J Primatol* 71:478–492. <https://doi.org/10.1002/ajp.20677>
- Mawah SSHA, Indim D, Rahman NAA, Majid SNBA (2015) Feeding ecology of proboscis monkey, *Nasalis larvatus* in Garama, Klias Peninsula, Sabah, Malaysia. *Malayan Nat J* 67:308–317
- Medway L (1969) Wild mammals of Malaya (Peninsular Malaysia) and Singapore. Oxford University Press, Kuala Lumpur, Malaysia
- Meek P, Ballard G, Fleming P, Falzon G (2016) Are we getting the full picture ? Animal responses to camera traps and implications for predator studies. *Ecol Evol* 6:3216–3225. <https://doi.org/10.1002/ece3.2111>

- Mildenstein TL, Stier SC, Nuevo-diego CE, Mills LS (2005) Habitat selection of endangered and endemic large flying-foxes in Subic Bay, Philippines. *Biol Conserv* 126:93–102. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.001>
- Morris RJ (2010) Anthropogenic impacts on tropical forest biodiversity: a network structure and ecosystem functioning perspective. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:3709–3718. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0273>
- Oliveira-Santos LGR, Tortato MA, Graipel ME (2013) Activity pattern of Atlantic Forest small arboreal mammals as revealed by camera traps. *J Trop Ecol* 24:563–567. <https://doi.org/10.1017/S0266467408005324>
- Orwa C, Mutua A, Kindt R, et al (2009) *Nauclea orientalis* L. Agroforestry Database a tree Ref. Sel. Guid. version 4.0. 0:1–5
- Peres CA (1999) General guidelines for standardizing line-transect surveys of tropical forest primates. *Neotrop Primates* 7:11–16
- Peres CA (1991) Seed predation of *Cariniana micrantha* (Lecythidaceae) by brown capuchin monkeys in Central Amazonia. *Biotropica* 23:262–270
- Raffa RB (2014) Kratom and other mitragynines: the chemistry and pharmacology of opioids from a non-opium source. CRC Press
- Ricklefs RE (2008) Disintegration of the ecological community. *Am Nat* 172:741–750. <https://doi.org/10.1086/593002>
- Rodríguez-Rodríguez MC, Jordano P, Valido A (2017) Functional consequences of plant-animal interactions along the mutualism-antagonism gradient. *Ecology* 98:1266–1276. <https://doi.org/10.1002/ecy.1756>
- Ross J, Hearn a. J, Johnson PJ, Macdonald DW (2013) Activity patterns and temporal avoidance by prey in response to Sunda clouded leopard predation risk. *J Zool* 290:96–106. <https://doi.org/10.1111/jzo.12018>
- Rovero F, Zimmermann F, Berzi D, Paul M (2013) “Which camera trap type and how many do I need ?” A review of camera features and study designs for a range of wildlife research applications. *Hystrix, Ital J Mammal* 24:148–156. <https://doi.org/10.4404/hystrix-24.2-6316>
- Schipper J (2007) Camera-trap avoidance by kinkajous *Potos flavus*: rethinking the “non-invasive” paradigm. *Small Carniv Conserv* 36:38–41
- Silveira L, Jácomo ATA, Diniz-Filho FD-F (2003) Camera trap, line transect census and track surveys: a comparative evaluation. *Biol Conserv* 114:351–355. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00063-6)
- Singmann H, Bolker B, Westfall J, Aust F (2017) afex: analysis of factorial experiments.
- Stocker AGC, Irvine AK (1983) Seed dispersal by cassowaries (*Casuarius casuarius*) in North Queensland’s rainforests. *Biotropica* 15:170–176
- Sussman RW, Tattersall I (1981) Behavior and ecology of *Macaca fascicularis* in Mauritius: A preliminary study. *Primates* 22:192–205. <https://doi.org/10.1007/BF02382610>
- Tewksbury JJ, Levey DJ, Haddad NM, et al (2002) Corridors affect plants, animals, and their interactions in fragmented landscapes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12923–12926. <https://doi.org/10.1073/pnas.202242699>
- Thiry V, Stark DJ, Goossens B, et al (2016) Use and selection of sleeping sites by proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*, along the Kinabatangan River, Sabah, Malaysia. *Folia Primatol* 87:180–196. <https://doi.org/10.1159/000449219>
- Tsuji Y, Ningsih JIDP, Kitamura S, et al (2017) Neglected seed dispersers: Endozoochory by Javan lutungs (*Trachypithecus auratus*) in Indonesia. *Biotropica* 0:1–7. <https://doi.org/10.1111/btp.12439>

8 Discussion générale et conclusion



“There is only so much one can do to conserve the animals one studies by only studying them. The often-romanticised image of a researcher spending much of his/her life in the forests, living with and protecting the animals, to put it bluntly, belongs only in the realm of fairytales. Real-world conservation is as much, if not more so, about campaigning, lobbying and negotiations rather than following monkeys around swamps. Conservation is anthropocentric – people and politicians decide much of the fate of all wildlife and wild habitats on this planet.”

Lhota et al. (2019b)

8.1 Principales découvertes

Cette thèse de doctorat s'inscrit clairement dans le contexte de la perte et de la fragmentation des habitats, l'une des principales menaces qui pèse sur la biodiversité terrestre (Newbold *et al.*, 2015), en particulier sous les tropiques (Laurance, 1999). Pour maintenir et protéger la diversité biologique, et assurer la survie d'espèces menacées, il est indispensable de développer des plans d'action et de mettre en place des mesures de conservation ciblées. Pour ce faire, il faut disposer des données de base sur ces espèces, en particulier la distribution géographique, le statut des différentes populations et leurs tendances ainsi que des données éco-éthologiques qui permettent d'évaluer les réponses des espèces ou des populations face aux changements environnementaux (Wilson, 1988; Primarck, 1993). Face au déclin des populations de la majorité des espèces de primates non-humains, des mesures de conservation doivent être prises à court terme et les chercheurs doivent y contribuer (Estrada *et al.*, 2017). Si le suivi quotidien des individus au sein de leur domaine vital est la méthode traditionnelle de collecte de données comportementales d'une espèce, le développement permanent de technologies relativement récentes (ex : colliers GPS, *camera traps*, analyses génétiques) permet aussi de rassembler les données indispensables à la conservation des espèces menacées.

Lorsque nous avons débuté notre étude, nous savions que le régime alimentaire des nasiques était diversifié (Matsuda *et al.*, 2009b) et variait en fonction des habitats (Salter *et al.*, 1985; Bennett & Sebastian, 1988; Yeager, 1989; Matsuda *et al.*, 2009b), mais nous ne disposions d'aucune donnée propre à notre site d'étude. De plus, nous savions que de faibles proportions de fèces pouvaient contenir des graines intactes (Matsuda *et al.*, 2013a), mais ne connaissions pas le devenir de ces dernières. Dès lors, nous avons décidé de focaliser notre projet de recherche sur l'écologie alimentaire du nasique (**objectif 1**) et sur le rôle potentiel que pourrait jouer ce primate dans la dispersion des graines dans les forêts fragmentées du *LKWS*, à Sabah (**objectif 2**). Ce travail a tout d'abord montré que plusieurs méthodes pouvaient être utilisées pour étudier le régime alimentaire des nombreux groupes de nasiques non-habitués, fournissant des résultats cohérents et complémentaires. Au sein du *LKWS*, nous avons montré que le nasique présente un régime alimentaire varié (au moins 89 taxons de plantes), davantage frugivore lors de la saison des pluies. Ces données alimentaires corroborent les résultats d'une précédente étude illustrant que *N. larvatus* présente un régime alimentaire diversifié (188 plantes) en forêt riveraine et préfère les fruits immatures – par rapport aux jeunes feuilles – durant certaines périodes de l'année (Matsuda *et al.*, 2009b). Notre étude confirme la petite taille des particules fécales chez le nasique ($MPS_{(0.063-16mm)} = 0.55 \pm 0.14$ mm), comme observé précédemment ($MPS_{(0.063-16mm)} = 0.53 \pm 0.09$ mm) (Matsuda *et al.*, 2014b). De plus, nous constatons une variation saisonnière de la taille des particules fécales chez cette espèce de colobiné, traduisant une variation de l'efficacité de mastication selon les saisons et confirmant un changement alimentaire. Des variations saisonnières de la taille des particules fécales avaient déjà été recensées chez une autre espèce de primate folivore, le Gelada (*Theropithecus gelada*), mais n'avaient pas encore été investiguées chez *N. larvatus*. En analysant la

composition nutritionnelle et minérale de 10 espèces de plantes consommées par les nasiques dans le *LKWS*, notre étude a ensuite mis en évidence des variations de la qualité nutritive des aliments selon la partie de la plante consommée (jeunes feuilles ou fruits immatures), l'espèce considérée et sa localisation par rapport au cours d'eau. Nos résultats soutiennent ceux de précédentes études (Yeager *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 2013b), confirmant que les nasiques sélectionnent des jeunes feuilles avec un ratio protéines/fibres élevé. Finalement, notre travail a fourni les premiers résultats de tests de germination effectués avec des graines déféquées par les nasiques. Il a révélé le rôle que joue le nasique dans la dispersion des graines de certaines espèces de plantes, comme *Nauclea* spp.; un rôle sous-estimé jusqu'alors (Matsuda *et al.*, 2013a). De plus, à l'aide d'observations directes et de *camera traps*, nous démontrons que de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux utilisent également *N. orientalis* le long des rives du fleuve Kinabatangan. Notre étude fournit de nouvelles données écologiques sur *N. orientalis* et illustre la nécessité de préserver ces zones riveraines.

Notre étude a permis de contribuer à améliorer les connaissances sur l'écologie alimentaire du nasique (objectif 1) et a mis en évidence le rôle que joue le nasique dans la dispersion des graines (objectif 2).

8.1.1 L'écologie alimentaire d'un primate menacé

Notre travail est le premier à s'être intéressé à l'étude du régime alimentaire de *Nasalis larvatus* à l'aide d'une nouvelle technologie génétique : le *DNA metabarcoding*. Cette méthode non-invasive s'est avérée appropriée pour étudier le régime alimentaire d'individus non-habitués, fournissant des résultats similaires et complémentaires à ceux obtenus par une méthode plus traditionnelle (les observations comportementales directes en bordure de fleuve). En effet, si 80% des familles et 50% des genres de plantes identifiés lors des observations directes sont également détectés par *DNA metabarcoding* (similarité), il en est autrement au niveau de l'espèce, puisque moins de 17% des espèces sont communes aux deux méthodes, chacune d'elles fournissant des taxa non-détectés par l'autre méthode (complémentarité). Toutefois, une comparaison « stricte » des deux méthodes requiert une certaine retenue. En effet, fournissant des données alimentaires différentes, ces **deux méthodes** présentent des **avantages et inconvénients** qui leurs sont propres ; nous les reprenons ci-dessous.

Le *DNA metabarcoding* fournit des données alimentaires journalières (voire plus, étant donné les longs temps de rétention de *N. larvatus*) et semble une méthode plus appropriée pour identifier les espèces de lianes consommées par les individus. Ses principaux inconvénients résident clairement dans sa faible résolution taxonomique (avec trnL), son incapacité d'identifier quelle partie exacte de la plante a été ingérée par les individus et en quelle quantité, ainsi que sa faible détection des événements de frugivorie (Valentini *et al.*, 2009). Ce dernier biais est d'ailleurs largement confirmé dans notre travail par le manque de correspondance entre l'occurrence du genre *Nauclea* (graines dans les fèces) et de la famille Rubiaceae (détectée par *DNA metabarcoding*) dans les fèces de nasiques. La méthode des

observations directes présente, quant à elle, la possibilité d'identifier quelle partie de l'aliment est consommée par les individus, ainsi que dans quelles quantités, elle permet également une résolution taxonomique très élevée (ici, 81% des taxes sont identifiés jusqu'à l'espèce). Toutefois, restreinte spatio-temporellement dans notre étude, cette méthode ne couvre pas le régime alimentaire journalier du nasique.

Notre travail met en évidence le **régime alimentaire varié (89 taxons de plantes)** de *N. larvatus* dans les lots 5, 6 et 7 du *LKWS*. Cette diversité alimentaire est à mettre en parallèle avec la composition végétale très diversifiée de ces forêts riveraines de Bornéo (Matsuda *et al.*, 2019b). Il faut souligner que 21 genres de plantes n'avaient pas encore été décrits dans l'alimentation de ce colobiné par de précédentes études (Boonratana, 2003; Matsuda *et al.*, 2009b). Les différences observées avec ces dernières [notamment, avec la plus complète, de Matsuda *et al.* (2009b)] peuvent dépendre de divers facteurs. Tout d'abord, bien que les méthodes utilisées pour recenser la végétation diffèrent selon les études (ex : surfaces totales couvertes, plots ou transects), nous constatons que les compositions végétales varient d'un site à l'autre. Ensuite, les méthodes utilisées pour étudier le régime alimentaire des nasiques varient également selon les études (ex : nombres de groupes étudiés/suivis ; méthodes de focal, scan, ad libitum sampling ou de *DNA metabarcoding* ; heures de la journée allouées aux observations ; et nombres d'heures d'observations), influençant les types de données collectées. En effet, lors de notre étude, nous avons recensé des taux de frugivorie (collectés lors des observations directes en bordure de fleuve) considérablement plus faibles (5%) que dans de précédentes études, où ils oscillaient entre 26% (Matsuda *et al.*, 2009b), 40% (Yeager, 1989) et 50% (Bennett & Sebastian, 1988). Cette différence résulte vraisemblablement d'un biais méthodologique, puisque nos observations directes étaient restreintes, tant spatialement (bordure du fleuve) que temporellement (aube et crépuscule). Toutefois, malgré de faibles taux de frugivorie, une variation saisonnière semble néanmoins ressortir. En effet, davantage de frugivorie est observée en saison des pluies qu'en saison sèche (Chap. 3), et l'utilisation d'autres méthodes – analyses manuelles des fèces et machine à tamis animée (Chap. 4) – corrobore ce résultat.

Dans notre thèse, nous avons mesuré la **taille des particules fécales (MPS)** chez *N. larvatus*. L'utilisation de cette méthode non-invasive nous a permis de confirmer que les nasiques présentent une MPS fécale de très petite taille (0.45 ± 0.14 mm) et donc une bonne efficacité de mastication ; ces résultats sont similaires à ceux d'une précédente étude (Matsuda *et al.* 2014). Notre travail a également mis en évidence l'existence d'une **saisonnalité** : la MPS fécale est plus petite en saison des pluies qu'en saison sèche. Notre étude est ainsi la première à souligner l'existence d'un patron saisonnier chez *N. larvatus*, à l'aide de cette méthode d'analyse par « wet sieving ». Un résultat similaire a été mis en évidence chez une autre espèce de primate folivore – le Gelada (*Theropithecus gelada*) – dont la faible MPS fécale rimait avec une alimentation saisonnière moins dure (*sensu stricto*), et donc plus digeste (Venkataraman *et al.*, 2014). Dans notre cas, il est aussi probable qu'un changement alimentaire soit à l'origine de plus petites MPS fécales. En effet, en saison des pluies, il semble que les nasiques sont

davantage frugivores dans notre site d'étude : ils consomment plus de fruits en bordure de fleuve (Chap. 3) et une proportion plus élevée de leurs fèces contiennent des graines (Thiry et al. 2018, Chap. 4). Bien que notre étude ne se soit pas concentrée sur les propriétés mécaniques des fruits consommés par les nasiques, nous savons que la dureté des feuilles est un facteur déterminant dans la sélection des espèces de plantes qu'ils ingèrent : les feuilles moins dures étant généralement préférées (Matsuda *et al.*, 2017). De manière générale, en comparaison aux feuilles, les fruits et graines sont considérés comme des aliments de haute qualité nutritive (Milton, 1993; Hanya & Bernard, 2015). Contenant moins de fibres que les feuilles, les fruits sont généralement plus digestes (Milton, 1993). Dès lors, un régime davantage frugivore devrait mener à des MPS fécales plus petites. Bien que la composition nutritive des feuilles consommées par les nasiques ait déjà été étudiée à maintes reprises (Yeager *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 2013b, 2017), celle des fruits immatures – pourtant préférés à certains moments de l'année (Matsuda *et al.*, 2009b) – restait un mystère. Dans notre travail, nous nous sommes dès lors intéressés à **l'aspect nutritionnel** des jeunes feuilles et des fruits immatures consommés par les nasiques dans notre site d'étude. Nous avons observé que les fruits immatures de deux espèces végétales, *Ficus racemosa* et *Nauclea orientalis*, contenaient plus de lipides, mais moins de protéines et de minéraux (Mg) que les jeunes feuilles. Aucune différence ne fut constatée pour leurs contenus respectifs en fibres (Chap. 5). Toutefois, ces premiers résultats sur la composition nutritive des fruits immatures consommés par les nasiques dans le *LKWS* restent préliminaires, ne tenant compte que de deux espèces végétales dont les fruits furent analysés entièrement (pulpe et graines ensemble).

Bien que peu documentée dans l'écologie alimentaire du nasique jusqu'à présent (Boonratana, 2003; Matsuda *et al.*, 2009b), l'espèce végétale *Ficus racemosa* présente un intérêt alimentaire majeur dans notre site d'étude (Chap. 3). Abondante le long des rives du fleuve Kinabatangan (Azmi 1998, pers. obs.), elle est aussi souvent sélectionnée par les nasiques comme espèce dortoir, c'est-à-dire pour y passer la nuit (Thiry *et al.*, 2016), et présente des jeunes feuilles de haute qualité nutritionnelle (protéines) et minérale (Potassium) (Chap. 5). Notre étude confirme que les nasiques suivent la même tendance que les autres colobinés, sélectionnant de jeunes feuilles riches en protéines et pauvres en fibres (Chapman *et al.*, 2004; Fashing *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2013b). Toutefois, puisque les jeunes feuilles sont généralement considérées comme des aliments de moindre qualité (en comparaison aux fruits) (Milton, 1993; Hanya & Bernard, 2015), les colobinés peuvent mettre en place certaines stratégies, sélectionnant les espèces végétales dont les jeunes feuilles sont de meilleure qualité (Oates *et al.*, 1980; Milton, 1993; Fashing *et al.*, 2007; Hanya & Bernard, 2015). Il semble que dans notre site d'étude, *F. racemosa* remplisse ce critère pour les nasiques. Toutefois, puisque nos données sont majoritairement basées sur des observations comportementales en bordure du fleuve Kinabatangan¹¹, et

¹¹ Il est fort probable que le taxa *Ficus* 1, top-2 des espèces alimentaires de *N. larvatus* détectées par *DNA metabarcoding*, corresponde à *F. racemosa*. Mais nous ne pouvons toutefois pas l'affirmer avec certitude.

que l'abondance des espèces végétales préférées (Matsuda *et al.*, 2013b) et leur distribution spatiale (Matsuda *et al.*, 2017) sont aussi des facteurs-clés dans la sélection alimentaire chez *N. larvatus*, il serait intéressant d'analyser la disponibilité et la distribution de *F. racemosa* au sein des lots du LKWS, pour voir si cette espèce peut déterminer en partie les déplacements des nasiques au sein de leurs domaines vitaux. Dans ce travail, nous avons par exemple mis en évidence que la qualité nutritionnelle des jeunes feuilles de certaines espèces était plus élevée (riches en protéines et Calcium) en bordure de fleuve qu'à une distance de > 250 m des cours d'eau. Dès lors, ces premiers résultats suggèrent que la proximité du cours d'eau (Matsuda *et al.*, 2013b) ainsi que l'exposition plus importante au soleil (Ganzhorn, 1995) sont des facteurs qui peuvent influencer la qualité nutritionnelle du feuillage (Chap. 5).

Enfin, notre travail souligne **l'importance de plusieurs espèces végétales**, telles que *Ficus racemosa*, *Octomeles sumatrana*, *Nauclea orientalis*, *Dracontomelon dao*, *Pterospermum elongatum* et *Vitex pinnata*, essentielles pour l'écologie – notamment alimentaire – du nasique dans notre site d'étude. Cette thèse de doctorat montre que les espèces végétales-clés dans les Lots 5, 6 et 7 du LKWS diffèrent de celles d'autres sites (Boonratana, 2003; Matsuda *et al.*, 2009b) – pourtant proches (Lot 4 du LKWS). En effet, l'écologie d'une espèce peut varier d'un site à l'autre (Primarck, 1993). Dès lors, ce constat nous pousse à insister sur l'importance d'entreprendre ce type de recherche dans des sites d'étude différents, afin d'approfondir nos connaissances sur l'écologie de ce primate menacé, afin de pouvoir assurer au mieux sa conservation.

8.1.2 Le nasique, jardinier des forêts du LKWS

Bien que les nasiques – et les colobinés de manière plus générale – aient longtemps été considérés comme d'exclusifs prédateurs de graines, notre étude a démontré qu'ils jouaient bel et bien un **rôle dans la dispersion des graines** de certaines espèces de plantes (Thiry *et al.* 2019, Chap. 6). En effet, lors de notre recherche, nous avons déterminé qu'au moins huit espèces de plantes étaient dispersées par les nasiques dans le LKWS et que six d'entre elles étaient capables de germer après passage dans le tube digestif du nasique. De plus, des tests de germination plus approfondis nous ont permis de mettre en évidence l'influence positive du nasique sur la germination des graines de *Nauclea* spp. : les graines déféquées germant davantage que celles issues de fruits immatures et matures de *Nauclea orientalis*. Les différences observées avec une étude précédente (ex : peu de fèces contenant des graines ; faible diversité et densité de graines dans les fèces) (Matsuda *et al.*, 2013a) dépendent probablement de divers facteurs, tels que les compositions végétales qui varient entre les sites ou encore les différentes méthodologies utilisées.

Comment les nasiques peuvent-ils influencer la germination des graines de *Nauclea* spp. ? D'une part, le passage à travers le tractus digestif des nasiques peut ramollir l'enveloppe extérieure des graines, facilitant ainsi les échanges gazeux et l'absorption d'eau nécessaires pour la germination (Barnea *et al.*, 1990). De plus, les graines déféquées par les nasiques commencent à germer plus tôt et

plus vite que les graines issues de fruits contrôlés ; cette différence est particulièrement marquée dans les conditions d'ombre (lors des 60 premiers jours de l'expérience). Les nasiques favoriseraient ainsi la germination des graines dans des conditions moins favorables (sans soleil), réduisant les risques potentiels de prédation et permettant alors aux plantules de s'établir plus tôt. D'autre part, puisqu'un fruit de *N. orientalis* se compose de milliers de graines (Lim, 2013), la consommation et dispersion par les nasiques – ou d'autres espèces animales d'ailleurs – peut permettre de diminuer la densité des graines et donc la compétition entre ces dernières (Barnea *et al.*, 1992), facilitant ainsi leur germination.

Toutefois, il faut garder à l'esprit que le nasique n'est pas l'unique espèce animale dispersant les graines *Nauclea* spp. dans le *LKWS* ; il est donc essentiel de resituer notre découverte dans un contexte plus global. Tout d'abord, à l'aide de transects le long du fleuve Kinabatangan et de *camera traps* disposées dans les arbres de *N. orientalis* (ainsi qu'au sol), nous avons pu constater que d'autres espèces de mammifères et d'oiseaux dépendaient également de *N. orientalis* pour leur écologie (ex : alimentation, refuge) (Chap. 7). En consommant les fruits de cette espèce, nombre de frugivores contribuent probablement aussi à la dispersion de ses graines au sein du *LKWS*. En général, on suppose que la contribution des colobinés à la dispersion des graines est moindre, en comparaison à celle d'autres espèces sympatriques, puisqu'ils dispersent peu d'espèces de graines¹² et sur de courtes distances (Tsuji *et al.*, 2017; McConkey, 2018). Cependant, étant donné la large distribution des colobinés en Afrique et en Asie, ainsi que l'importante biomasse qu'ils constituent au sein des forêts tropicales, leur rôle en tant que disperseurs de graines mérite d'être davantage considéré. De plus, puisque les colobinés consomment préférentiellement des fruits immatures et dispersent les graines sur de relativement courtes distances, il est fort probable qu'ils fournissent un **service écologique complémentaire** à celui d'autres espèces, comme les gibbons ou les macaques, qui se nourrissent de fruits mûrs et dispersent les graines sur de plus longues distances (McConkey, 2018). Il est important de rappeler que, dans notre étude, nous avons constaté que les graines des fruits immatures de *N. orientalis* germaient mieux que celles des fruits mûrs, soulignant l'avantage potentiel pour cette espèce d'arbre d'être consommée par des colobinés, dont les nasiques.

8.2 Limites de l'étude et perspectives

Notre thèse est une contribution aux connaissances sur l'éco-éthologie de *Nasalis larvatus* en forêt riveraine. Ce travail fournit d'une part les premières données alimentaires pour les groupes présents dans les Lots 5, 6 et 7 du *LKWS* et démontre, d'autre part, que les nasiques influencent positivement la germination des graines de *Nauclea* spp. . Notre étude est la première à s'être concentrée sur l'étude du

¹² Dans notre étude, 8 espèces de graines sont dispersées par les nasiques, alors que les macaques à queue de cochon, *Macaca leonina*, en Thaïlande, par exemple, dispersent les graines de 88 espèces de plantes dans leur fèces (Albert *et al.*, 2013).

régime alimentaire de *N. larvatus* à l'aide du *DNA metabarcoding*, une méthode génétique relativement récente. Elle constitue dès lors une base de référence pour de futures études (utilisant cette méthode génétique) portant sur l'alimentation de *N. larvatus* dans diverses régions de l'île, ou sur l'alimentation d'autres espèces animales vivant au sein du *LKWS*. En effet, notre travail a permis l'élaboration d'une nouvelle base de données de référence (gène *trnL*), ainsi que d'un herbier, pour ce site d'étude ; tous deux sont accessibles gratuitement. Toutefois, plusieurs aspects complémentaires de l'écologie alimentaire de *N. larvatus* et du rôle que joue ce primate dans la dispersion des graines mériteraient d'être pris en compte dans de futures recherches.

Il s'agirait avant tout d'améliorer la résolution taxonomique obtenue par la méthode de *DNA metabarcoding*. En effet, dans ce travail nous avons utilisé le gène chloroplastique *trnL*, le plus souvent utilisé dans les études de régime alimentaire herbivore. Toutefois, sa résolution n'est pas optimale (Moorhouse-Gann *et al.*, 2018). Les avancées techniques dans le domaine de la génétique devraient cependant aboutir à la mise en place d'un amplicon universel davantage discriminant entre espèces, dont l'utilisation serait clairement plus favorable dans de prochaines études. Par exemple, l'utilisation d'amplicons plus longs, tels que ITS2 ou ITS1, dans une approche en deux étapes, devrait permettre d'identifier davantage de taxa jusqu'à l'espèce (De Barba *et al.*, 2014; Moorhouse-Gann *et al.*, 2018). Améliorer la résolution taxonomique jusqu'à l'espèce est importante dans des études alimentaires puisque cela permettrait d'investiguer l'existence de certains patterns saisonniers (en lien avec les suivis phénologiques), mais aussi de discriminer *Nauclea orientalis* de *N. subdita* au sein des graines dispersées par les nasiques.

Rappelons que la base de données de référence que nous avons établie pour le *LKWS* est disponible pour toute prochaine recherche se déroulant dans ce site, quelle que soit l'espèce animale herbivore étudiée. De plus, l'herbier confectionné est accessible au BRLU (Bruxelles) ; il est dès lors possible d'extraire l'ADN des diverses espèces de plantes répertoriées et d'ainsi établir une nouvelle base de données de référence pour un autre amplicon. L'approche par *DNA metabarcoding* pourrait notamment être utilisée à l'échelle du paysage *LKWS*, permettant de mettre en évidence les interactions entre espèces animales et végétales au sein de ce site. Ce type de données serait susceptible de souligner l'importance de certaines essences végétales à prendre en considération dans l'établissement des futures mesures de conservation. Toutefois les analyses moléculaires sont coûteuses, et bien que de nombreuses études considèrent le *DNA metabarcoding* comme une méthode efficiente en termes de coûts (Pompanon *et al.*, 2012; Quéméré *et al.*, 2013; De Barba *et al.*, 2014), il est clair qu'actuellement seuls les laboratoires disposant de financements conséquents peuvent supporter les coûts initiaux engendrés par l'investissement des nouvelles technologies de séquençage (NGS ou HTS¹³) (Piper *et al.*, 2019). Dans notre étude, ~ 4 500 € furent nécessaires pour réaliser le projet de *DNA metabarcoding*, soit un

¹³ NGS = Next Generation Sequencing; HTS = High-Throughput Sequencing. Ces termes sont synonymes.

coût estimé à ~17 € / échantillon fécal et 9€ / échantillon végétal (pour la base de données locale)¹⁴. Toutefois, on s'attend à ce que les coûts des analyses génétiques se démocratisent ces prochaines années, notamment grâce à l'optimisation des technologies de séquençage (Ficetola *et al.*, 2019). Il est fort probable que le *DNA metabarcoding* devienne une méthode incontournable pour les scientifiques, notamment dans le cadre du suivi de la biodiversité (ex : le monitoring) (Ruppert *et al.*, 2019). L'utilisation du *DNA metabarcoding* pourrait être utile en biologie de la conservation : l'identification d'espèces menacées au sein de certains habitats fournirait par exemple des données qui pourraient ensuite être valorisées pour protéger des zones d'intérêt (Deiner *et al.*, 2017). Nécessitant des compétences en séquençage (laboratoire), ainsi qu'en bio-informatique et statistique (Yoccoz, 2012), le *DNA metabarcoding* est une méthode prometteuse qui nécessitera que les scientifiques collaborent et se coordonnent (Ruppert *et al.*, 2019).

Si plusieurs études (dont la nôtre) se sont concentrées sur le régime alimentaire de *N. larvatus* dans les forêts riveraines, des données alimentaires sont à ce jour incomplètes dans de nombreux habitats inondés comme les mangroves et les forêts mixtes « mangroves-riveraines » (Bernard *et al.*, 2019). Ces habitats (partiellement) inondés sont difficiles d'accès et limitent les possibilités de suivre à pied les individus (Bennett & Sebastian 1988). Les observations éco-éthologiques sont généralement réalisées par bateau, essentiellement le matin et en fin d'après-midi (Bernard *et al.*, 2019). Dès lors, utiliser la méthode de collecte des fèces de *N. larvatus* (sous les sites dorts) couplée au *DNA metabarcoding* permettrait de fournir davantage d'informations sur l'écologie alimentaire des groupes vivant dans ces zones inondées.

Une autre difficulté propre à notre travail est l'absence d'identification des individus et des groupes de nasiques tout au long de l'étude. Puisqu'il ne nous était pas possible de distinguer les groupes les uns des autres, il est probable que certains d'entre eux aient été davantage échantillonnés, par rapport à d'autres ; et ce, malgré notre design méthodologique qui visait à varier les lieux de collectes au sein d'un même mois. De plus, la collecte de fèces s'effectuant une fois le groupe de nasiques parti dans les terres, nous ne connaissions ni la classe d'âge, ni le sexe des individus dont les échantillon fécaux étaient collectés. Une précédente étude illustre des différences inter-sexes chez *N. larvatus* : les mâles passent plus de temps à se nourrir que les femelles (Matsuda *et al.*, 2009b). L'utilisation d'un marqueur génétique [ex : 2Y/1X (Cadamuro *et al.*, 2015)] permettrait de déterminer le sexe des échantillons fécaux collectés¹⁵ et d'étudier si les espèces végétales consommées varient entre individus de sexe opposé.

¹⁴ Ici, sont pris en compte uniquement les frais de laboratoire, c'est-à-dire les dépenses engendrées par les extractions, amplifications et séquençages des fèces et des plantes (construction de la base de données locale), sans tenir compte des investissements des laboratoires dans l'acquisition des séquenceurs, ni des dépenses effectuées pour les collectes sur le terrain.

¹⁵ Le coût du sexe-typage est estimé à 2€/échantillon (Cadamuro *et al.*, 2015)

Notre étude est la première à mettre en lumière le rôle que joue le nasique dans la dispersion des graines de certaines espèces végétales, comme *Nauclea* spp. Toutefois plusieurs composantes sont encore à investiguer. Certes, améliorer le succès de germination des graines dans des conditions expérimentales contrôlées (ex : boîte de Pétri, grillage contre la prédation) est une première étape dans l'étude du processus de régénération forestière. Toutefois, les étapes ultérieures – la composante « post-dispersion » (Figure 6) – mériteraient elles aussi d'être étudiées. Pour ce faire, de prochaines études pourraient utiliser les méthodes mises en place par Culot (2009)¹⁶. Une fois le rôle des disperseurs secondaires mieux connu, il serait intéressant d'également identifier – à l'aide de *camera traps* et de marquage de graines par exemple (Jansen & Ouden, 2005) – quelles espèces de vertébrés sont attirées par les graines contenues dans les fèces de *N. larvatus* et les consomment, détruisent, déplacent ou cachent. L'étude de ces différents aspects devrait permettre d'évaluer l'efficacité de dispersion des graines [Seed Dispersal Effectiveness (SDE) (Schupp, 1993)¹⁷] par les nasiques et d'ainsi comparer les services écologiques rendus par rapport à ceux fournis par d'autres frugivores du LKWS. Puisque nos résultats (77% de fèces contenant des graines intactes) contrastent avec ceux de précédentes études (Ranglack & Yeager, 1986; Matsuda *et al.*, 2013a) et que l'efficacité des disperseurs dépend du contexte environnemental (ex : saison, habitat) (Culot, 2009) : il serait intéressant d'utiliser la même méthode d'analyse de fèces que la nôtre (ex : tamis et binoculaire) afin d'évaluer le rôle que jouent les nasiques dans d'autres sites d'études. Enfin, maintenant que le rôle du nasique dans la dispersion de graines a été mis en évidence, il serait intéressant d'évaluer celui des autres espèces de colobinés présentes dans le LKWS (ex : *Presbytis hosei*, *P. rubiconda* et *Trachypithecus cristatus*). Il est probable que ces espèces – dont l'effectif des populations diminue – jouent également un rôle non négligeable dans la dispersion des graines de certaines essences végétales. Des telles données permettraient d'attirer davantage l'attention sur l'importance de protéger ces espèces de primates : il est reconnu que la perte des disperseurs est susceptible d'affecter durablement la diversité et la dynamique des forêts (Beaune *et al.*, 2013; Harrison *et al.*, 2013; Caughlin *et al.*, 2014; Petre *et al.*, 2015).

Notre travail démontre que la collecte d'échantillons fécaux et d'observations comportementales à distance permet de rassembler des données éco-éthologiques importantes. Des futures études, axées sur l'écologie d'espèces animales menacées, pourraient être menées sur base de designs méthodologiques similaires présentant l'intérêt d'être non-invasifs.

¹⁶ D'une part, la méthode de pièges « *pitfall traps* avec fèces » pour identifier la communauté de bousiers, et d'autre part la méthode de marquage des graines avec un fil de nylon (et couvertes d'une cage) pour suivre la germination des graines (et empêcher la prédation par les rongeurs).

¹⁷ SDE = Seed Dispersal Effectiveness, soit la quantité x la qualité des graines dispersées ; où quantité = le nombre de graines dispersées, et qualité = la probabilité de devenir une plante adulte (Schupp, 1993).

8.3 État de la conservation du nasique

Face à la diminution de la taille des populations de *Nasalis larvatus* et à la réduction drastique de ses habitats, **agir devient urgent**.

La taille des populations de *N. larvatus* a diminué de 50% en 40 ans. Les populations de Sarawak comptent moins de 1 000 individus et sont fragmentées. A Brunei, seule une population persiste (Meijaard *et al.*, 2008). A Sabah, la population totale de nasiques est estimée à 5 900 individus, répartis en 7 foyers de populations, dont 4 sont totalement isolés (Sabah Wildlife Department, 2019b). C'est à Kalimantan (la partie indonésienne de l'île de Bornéo) que les effectifs des populations de nasiques sont les plus importants (~ 12 700 individus) (Phillipps & Phillipps, 2016). Si ces chiffres peuvent paraître rassurants, rappelons que certaines populations, telles que celles de la réserve naturelle de l'île de Kaget et du delta du fleuve Mahakam, ont été décimées en peu de temps. Les causes responsables de ces extinctions sont essentiellement la destruction des forêts de basse altitude aux dépens des zones agricoles illégales sur l'île de Kaget, mais aussi la translocation des individus dans des sites non-protégés ou leur transfert en zoo et la conversion des zones côtières en élevages intensifs de crevettes dans le delta de Mahakam (Meijaard *et al.*, 2008).

Des estimations récentes indiquent que moins d'un quart du couvert forestier de l'île de Bornéo persistera en 2080 (Wich *et al.*, 2015). Or ces 25% constituent ce qu'on appelle « *the Green Heart of Borneo* », c'est-à-dire les forêts difficilement exploitables, dans les zones d'altitude (> 500 m asl) du centre de l'île (Figure 12b et Figure 19a), qui n'abritent aucune population de *N. larvatus* (Figure 18b). Les habitats des nasiques sont les zones de basse altitude (< 350 m asl), telles que les mangroves, les forêts riveraines et les forêts marécageuses (Meijaard & Nijman, 2000a; Meijaard *et al.*, 2008). Or, en comparaison aux autres types de végétation de l'île Bornéo, **les habitats côtiers et riverains – préférés de *N. larvatus* – sont les plus menacés** : ils sont les premiers à être convoités par l'homme pour l'établissement des terres agricoles et l'exploitation de bois d'œuvre, comme les diptérocarpes et les mangroves (Meijaard *et al.*, 2008). De plus, face à la perte de leurs habitats, certaines populations de nasiques se retrouvent confinées, à densité élevée, dans des patches forestiers de petites tailles (Lhota *et al.*, 2019b). Ce sont principalement les déboisements intensifs le long des cours d'eau et dans les mangroves qui menacent la survie de l'espèce. Les gigantesques feux de forêts, tels que ceux de 1997-1998, constituent aussi une réelle menace (Meijaard *et al.*, 2008). Enfin, les pressions de braconnage ne sont pas à négliger puisque *N. larvatus* est chassé illégalement pour sa viande, mais également pour la collecte des bézoards de leur estomac, prisés en médecine chinoise (Meijaard & Nijman, 2000a).

La situation devient critique et il est impératif de s'interroger sur le devenir à long terme de cette espèce menacée. Il dépendra très certainement de l'adéquation des mesures de conservation élaborées par les multiples parties prenantes ainsi que de leur implémentation sur le terrain. Une difficulté d'envergure à prendre en compte est évidemment que les mesures de conservation de la faune

sont généralement contradictoires avec les envies de développement économique des États (Lhota *et al.*, 2019b).

Bien que les nasiques soient présents au sein de 16 aires protégées sur l'ensemble de leur aire de distribution (Tableau 21) (Meijaard *et al.*, 2008), **la majeure partie des populations subsiste néanmoins en dehors de ces dernières** (Lhota *et al.*, 2019b). Pourquoi ? Les aires protégées sont généralement situées dans des zones de faible valeur économique (ex : zones difficiles d'accès et en altitude). Or, les habitats des nasiques – zones riveraines et côtières, de basse altitude – sont parmi les plus accessibles à l'homme et de ce fait les plus peuplés de Bornéo. Principalement exploités pour l'agriculture (plantations à grande échelle), les infrastructures, le logement et l'industrie, ils présentent une valeur économique commerciale très élevée. Conserver ces zones et les consacrer à des projets d'écotourisme est par conséquent très coûteux¹⁸ et constitue un réel frein. Jusqu'à présent, les zones marécageuses étaient moins intéressantes économiquement (ex : leur conversion en élevages de crevettes n'étant heureusement pas rentable partout), moins convoitées et constituaient donc de bonnes opportunités pour la conservation de *N. larvatus* et l'écotourisme. Or avec les nouvelles technologies, même les marais deviennent exploitables pour l'établissement d'industries et d'habitations et ces terres deviennent donc plus chères et difficiles à protéger (Lhota *et al.*, 2019a). Enfin, le statut d'aire protégée ne garantit aucunement sa préservation face aux pressions anthropiques diverses, y compris politiques. De nombreuses aires protégées dans lesquelles vivent les populations de nasiques sont fortement dégradées et illégalement déboisées (ex : Kutai *National Park*, Tanjung Puting *National Park*) (Meijaard & Nijman, 2000a). Ces intrusions au sein des zones protégées se font généralement en plusieurs étapes, parcelle par parcelle, rendant leur détection plus difficile. De surcroît, tout au long du processus, les propriétaires des concessions peuvent changer, les compagnies peuvent modifier leur nom et il n'est pas rare que de nombreux investisseurs et managers se succèdent. Ces techniques compliquent ou empêchent l'identification des responsables (Lhota *et al.*, 2019b). Notons que de manière générale (pas uniquement à Bornéo), en raison de l'absence de financement et de personnel suffisants, trop souvent les aires protégées ne sont que des « *paper parks* », c'est-à-dire des aires protégées « sur papier » dont la gestion n'est pas assurée efficacement (European Commission, 2018). **Il est fondamental que l'application des lois soit renforcées pour assurer une conservation efficiente des aires protégées** (Lhota *et al.*, 2019b).

¹⁸ On parle d'*opportunity costs*, c'est-à-dire les coûts qu'un projet d'écotourisme engendre en protégeant une zone et en l'empêchant ainsi d'être exploitée pour une activité profitable économiquement (Lhota *et al.*, 2019a).

Tableau 21. Localisations, superficies et catégories UICN des 16 aires protégées abritant *N. larvatus*

Localisations	Aires protégées	Superficies (Km ²)
Kalimantan occidental	Danau Sentarum Wildlife Reserve	1,320
	Gunung Palung Nature Reserve	900
	Kendawangan Nature Reserve	1,500
	Mandor Reserve	31
Kalimantan oriental	Kutai National Park	1,986
	Lesan Protection Forest	/
	Muara Kaman Nature Reserve	625
Kalimantan central	Tanjung Puting National Park	4,083
Sabah	Kabili-Sepilok Forest Reserve	55
	Klias National Park	36
	Kulamba Wildlife Reserve	204
	Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary	2,700
	Ulu Segama Reserve	2,429
Sarawak	Bako National Park	37
	Gunung Pueh Forest Reserve	130
	Sungai Samunsam Wildlife Sanctuary	61

Parmi ces 16 aires protégées, certaines (ex : *Bako National Park*, *LKWS*, etc.) sont des destinations touristiques fréquentes pour observer les nasiques dans leur milieu naturel. Très charismatiques, ces colobinés constituent l'une des principales attractions touristiques de l'île, en raison de leur look particulier et de la facilité avec laquelle il est possible de les observer (ex : en bordure de cours d'eau en fin de journée) (Meijaard & Nijman, 2000a; Lhota *et al.*, 2019a). Toutefois, il est impératif que les programmes d'écotourisme soient mieux gérés afin de réduire les perturbations qu'ils engendrent sur la faune sauvage (ex : limiter le nombre de bateaux sur les rivières, interdire l'utilisation des laser et lampes, respecter une distance de 20 m entre le bateau et les nasiques, etc.) (Stark, 2018). Protégé et à l'abri des nuisances diverses, le nasique constituera une vraie espèce emblématique pour la conservation des nombreuses zones humides (Meijaard & Nijman, 2000a).

8.4 Implications pour la conservation du nasique à Sabah

Au cours de notre thèse, nous avons participé au *Proboscis Monkey Workshop* en février 2017, dont les objectifs étaient, d'une part, d'analyser la viabilité des populations et des habitats de *N. larvatus* à Sabah (*Population and Habitat Viability Analysis* ou *PHVA*) et, d'autre part, d'établir un plan d'action pour la conservation du nasique à Sabah sur 10 ans (2019-2028) (Sabah Wildlife Department, 2019b).

En se basant sur l'étude de Sha et al. (2008), on estime la population totale de nasiques à Sabah à ~ 5 907 individus, répartie en sept foyers de populations, dont quatre sont isolés (non-connectés à un des autres foyers). Les simulations du *PHVA* révèlent que toutes les populations de nasiques à Sabah seront fortement affectées par les événements climatiques/océanographiques sévères *ENSO* (*El Niño - Southern Oscillation*) – dont on prédit une augmentation des fréquences avec les dérèglements climatiques. Pour assurer la conservation de *N. larvatus* et de ses habitats à Sabah, plusieurs actions prioritaires¹⁹ ont été mises en évidence dans le cadre du plan d'action (2019-2028). Y sont également repris, les raisons de leurs propositions, le temps nécessaire à leur mise en place, les acteurs responsables de leur mise en application (ex : *Sabah Forestry Department*, *Sabah Wildlife Department*, chercheurs, ONGs, communautés locales, etc.), ainsi que des indices pour en mesurer le succès. Le Tableau 22 ci-dessous reprend les principaux objectifs ; le *Sabah Wildlife Department* est responsable de l'implémentation de ce plan d'action (Sabah Wildlife Department, 2019b).

Tableau 22. Objectifs pour la conservation de *N. larvatus* à Sabah (2019-2028)

Objectif 1	Stopper la perte et la dégradation des habitats de <i>N. larvatus</i>
Objectif 2	Augmenter les surfaces de mangroves et forêts riveraines importantes pour <i>N. larvatus</i> et augmenter la connectivité entre les différents habitats de <i>N. larvatus</i>
Objectif 3	Monitoring et renforcement de la mise en œuvre des lois
Objectif 4	Recherche
Objectif 5	Conservation ex-situ, semi-naturelle et translocation
Objectif 6	Améliorer le niveau de sensibilisation et d'éducation, et renforcer les réglementations des activités écotouristiques permettant l'observation de <i>N. larvatus</i>
Objectif 7	Monitorer l'implémentation des plans d'action et de conservation

Suite à l'échec constaté sur des îles indonésiennes, fin des années 90 (Meijaard & Nijman, 2000b), la translocation des groupes de nasiques n'est absolument pas une solution à envisager pour assurer la conservation de l'espèce (Stark, 2018). Dès lors, il est impératif de mettre l'accent sur la conservation des habitats de *N. larvatus*. Le plan d'action pour la conservation du nasique à Sabah (2019-2028) insiste clairement sur les deux premiers objectifs, c'est-à-dire le maintien et l'augmentation des surfaces forestières – et de leur connectivité – dans les mangroves et zones riveraines, particulièrement importantes pour l'espèce.

¹⁹ Deux types d'actions prioritaires sont reprises : 1) générales à l'ensemble des sites où vivent les nasiques ; et 2) spécifiques à chacun de ces sites.

Protection des habitats de *N. larvatus*

Dans un premier temps, il est essentiel de s'assurer que les habitats dans lesquels *N. larvatus* vit actuellement soient protégés et ne subissent plus de dégradations (Objectif 1). Par exemple, dans le *LKWS*, il faut s'assurer que les zones riveraines – que les nasiques préfèrent – ne soient plus déboisées (Stark, 2018). Notre étude confirme l'importance des **zones bordant le fleuve**, tant pour les sites dorts de l'espèce (Thiry *et al.*, 2016), que pour la qualité nutritive des jeunes feuilles des plantes consommées par les nasiques (Chap. 5). De plus, outre *N. larvatus*, bien d'autres espèces animales fréquentent les forêts longeant le fleuve Kinabatangan (Chap. 7). Selon la loi, une bande de 20 mètres de forêt (réserve riveraine) doit être maintenue le long des cours d'eau de plus de 3 mètres de large (State of Sabah, 1998). Toutefois, une largeur de 20 mètres est clairement insuffisante si on prend en compte l'écologie de *N. larvatus* le long du fleuve Kinabatangan (Stark, 2018). Un autre point essentiel est la mise en application des lois : celles-ci ne sont pas toujours respectées (Stark *et al.*, 2017a). Pour **renforcer l'application des lois**, une option est d'impliquer les communautés locales et les ONG, en mettant en place des systèmes de patrouilles (ex : les Sabah's Honorary Wildlife Wardens) (Lhota *et al.*, 2019b; Sabah Wildlife Department, 2019b). Le titre d'*Honorary Wildlife Warden (HWW)* est attribué par le *SWD* aux personnes de tous horizons (secteur privé, communautés locales, ONG, agence gouvernementales, etc.) qui ont suivi une formation et réussi un examen. Les *HWW* ont pour mission de surveiller (patrouilles) et de rapporter toutes activités illégales (ex : braconnage, déboisement illégal, etc.) au *SWD* (Hutan, 2018; Lhota *et al.*, 2019b).

Pour augmenter les surfaces protégées, il est possible d'**acheter des parcelles de terre** aux propriétaires privés (*native lands*²⁰) et ensuite de les faire reconnaître comme « zones protégées » par les institutions nationales ou régionales. Cette procédure est par exemple mise en place par *World Land Trust (WLT)*, Hutan, *Rainforest Trust* et les autorités gouvernementales, pour établir le *Keruk Wildlife Corridor* (~ 200 ares) reliant deux zones protégées (le Lot 2 du *LKWS* et une parcelle de *VJFR*) (Hutan, 2018). Le succès de ce genre de projets de conservation nécessite la collaboration intense des divers intervenants, au niveau local, national et international (WLT, 2016).

Restauration des habitats de *N. larvatus*

Augmenter les surfaces forestières nécessaires aux nasiques et améliorer la connectivité entre les habitats abritant des populations de nasiques sont essentiels à la survie de l'espèce à long terme (Objectif 2 du plan d'action). Pour ce faire, une des actions prioritaires est de **réhabiliter les zones riveraines**, naturellement ou en **plantant des arbres** (Sabah Wildlife Department, 2019b). Restaurer

²⁰ Les *native lands* (littéralement « terres des natifs ») sont définies dans la *Sabah Land Ordinance* (1930) comme des terres qui ne pouvant appartenir, à perpétuité, qu'aux indigènes/natifs de Sabah. Les indigènes possèdent des droits [*Native Customary Rights (NCR)*] par rapport à ces terres (Nuar & Lunkapis, 2019)

les bords du fleuve Kinabatangan permettrait aussi d'augmenter la stabilité des rives qui s'érodent davantage en l'absence de couverture forestière (Horton *et al.*, 2017). De plus, lorsque des plantations de palmiers à huile sont classées « non-productives » [comme ~1 400 hectares le long du fleuve Kinabatangan, suite aux inondations fréquentes (Matsuda *et al.*, 2018)], il faudrait inciter les propriétaires de ces terres – parfois déjà abandonnées – à les offrir, ou à offrir des compensations, aux parties intéressées (ex : *SWD*, *SFD*, *ONG*) pour qu'elles puissent être réhabilitées (par les ONG, volontaires, etc.) (Sabah Wildlife Department, 2019b). Toutefois, ces terres présentent une valeur économique élevée [ex : ~13 900 US\$ /ha dans la région Kinabatangan (Matsuda *et al.*, 2018)]. Une approche qui peut être pertinente est **la gestion des « habitats mixtes »** (Lhota *et al.*, 2019b). Un bon exemple est celui de la coopération entre l'ONG Hutan et la compagnie *Genting Plantations Berhad* (*GENP*). En 2016, *GENP* a alloué 7 parcelles (110 ares) couvertes de palmiers à huile à la conservation de la faune sauvage (en restant toutefois propriétaire des parcelles). Hutan peut à présent réhabiliter quelque peu la nature du site en plantant des espèces végétales entre les rangées de palmiers pour permettre à la forêt de se régénérer. De plus, l'ONG peut retirer les clôtures qui entouraient les parcelles, laissant ainsi la possibilité aux espèces animales de les traverser (ex : éléphants de Bornéo). Ce type d'accord - partenariat « public-privé » - peut servir de modèle pour la conservation des habitats des espèces menacées, tout particulièrement dans des paysages dominés par les plantations (Hutan, 2018). Une étude rapporte qu'une population de nasiques utilise des plantations d'arbres à caoutchouc (*Hevea brasiliensis*), à Kalimantan (Soendjoto, 2005). Ces plantations, gérées de manière non-intensives, appartiennent à de petits propriétaires privés et se composent d'arbres d'âges variés (Lhota *et al.*, 2019b). Dans ces « habitats mixtes », les nasiques arrivent à se nourrir des diverses espèces végétales présentes : *H. brasiliensis* et des espèces plantées (ex : *Syzygium* spp.) (Atmoko, 2002). Si cette stratégie semble applicable pour diverses cultures d'arbres à fruits (ex : jacquier, durio, etc.) (Lhota *et al.*, 2019b), elle paraît peu adaptée à l'égard des monocultures industrielles de palmiers à huile. Dans la région Kinabatangan, la problématique des plantations de palmiers à huile est pourtant centrale : à elle seule, cette zone comprend plus de 25% des surfaces plantées de l'État de Sabah (Hai *et al.*, 2001). Rappelons que les nasiques évitent ces plantations et se déplacent même plus rapidement dans les zones forestières qui les bordent pour les éviter (Stark, 2018). Il faudrait donc évaluer comment les nasiques utilisent ces « habitats mixtes ».

On considère généralement que les frugivores sont essentiels dans les efforts de restauration des habitats. Il est probable que les espèces d'arbres produisant des fruits attrayants pour les animaux attirent davantage de frugivores et donc potentiellement plus de graines déféquées/rejetées, que les espèces végétales aux fruits non-attractifs (Corlett & Hau, 2000). Dans le cadre de la restauration des habitats dégradés le long du fleuve Kinabatangan, il est important de **planter des espèces végétales comme *Nauclea orientalis* et *Ficus racemosa*** dont les fruits sont consommés par les animaux, nasiques et autres. Si la dispersion des graines par les vertébrés est un processus essentiel dans les dynamiques de régénérations forestières (Corlett, 1998), ce processus ne suffit pas à lui seul (Corlett & Hau, 2000). En

effet, bien d'autres aspects du cycle de régénération des forêts sont à prendre en compte (notamment la composante post-dispersion). Dès lors, dans les programmes de réhabilitation des zones dégradées (plantation d'arbres), il est important de prévoir un suivi mensuel (pendant la première année), puis trimestriel, pour protéger les jeunes arbres face aux lianes et autres plantes qui envahissent rapidement les zones ouvertes (Kopel, 2019). De plus, disposer des barrières électriques autour des zones nouvellement replantées permet de protéger les jeunes arbres des grands mammifères, tels que les éléphants de Bornéo ou cochons barbus (Hutan, 2019). Ces programmes sont donc assez coûteux puisqu'ils nécessitent de la main d'œuvre pendant 3 à 5 ans après plantation (Matsuda *et al.*, 2018). Ils permettent par ailleurs d'impliquer les membres des communautés locales, des enfants des écoles locales (ex : stages), et des volontaires, ce qui est déjà mis en place avec succès au niveau de la réserve *LKWS* (Hutan, 2019; Kopel, 2019).

Dans le cadre de notre doctorat, nous avons mis en évidence l'écologie alimentaire diversifiée de *N. larvatus* et attiré l'attention sur certaines essences végétales qui constituent une part importante de son régime alimentaire au niveau de la réserve *LKWS* (Chap. 3). Nous recommandons que *Ficus racemosa*, *Octomeles sumatrana*, *Nauclea orientalis*, *Dracontomelon dao*, *Pterospermum elongatum* et *Vitex pinnata* soient plantés dans les programmes de restauration des habitats le long du fleuve Kinabatangan.

Éducation & Conservation : Importance des animaux disperseurs de graines

Le renforcement des lois passe également par l'amélioration du niveau de sensibilisation et d'éducation (Objectif 6). En effet, il est important que les habitants des communautés locales, tels que les propriétaires de terres forestières, connaissent les lois en vigueur à Sabah (et dans le *LKWS*), ainsi que les conséquences du non-respect de celles-ci. Ces informations pourraient être communiquées par le biais de forums, par exemple (Sabah Wildlife Department, 2019b).

De plus, il est évident que l'éducation à la conservation est un aspect central pour assurer le maintien de la biodiversité sur Terre. Dans notre travail, nous avons mis en évidence le **rôle que joue le nasique dans la dispersion des graines** (Thiry *et al.* 2019, Chap. 6), et donc de l'importance potentielle de ce primate pour la dynamique et la régénération forestière sur l'île de Bornéo. Les mammifères, parmi lesquels les primates, sont d'importants disperseurs de graines au sein de forêts. Or, ils sont absents (ou rares) dans les habitats dégradés (Corlett & Hau, 2000). Insister sur cette interdépendance est une façon d'illustrer la nécessité de protéger la biodiversité et les primates en particulier, y compris *N. larvatus*, pour assurer le maintien des forêts et vice-versa. Des programmes d'éducation peuvent être mis en place dans les écoles par des ONG, communautés locales, scientifiques et volontaires.

La survie à long-terme de *N. larvatus* dépendra d'une approche tenant compte du contexte politique des régions dans lesquelles les populations subsistent et soutenant des actions de conservation

développées/validées par les recherches scientifiques (Lhota *et al.*, 2019b). L'implication des communautés locales est également déterminante, notamment dans les programmes d'écotourisme et d'éducation, les missions *d'Honorary Wildlife Wardens* et les plans de réhabilitation des zones dégradées. Bien qu'un plan d'action pour la conservation du nasique ait été développé pour l'État de Sabah (Sabah Wildlife Department, 2019b), il n'en existe pas dans les autres entités administratives de l'île : Brunei, Kalimantan et Sarawak. A Sabah, le succès des programmes pour la conservation de la faune dépend plus que jamais de la coordination et de l'implication du *Sabah Wildlife Department*, soutenu par le gouvernement et du travail remarquable que fournissent les ONG et les chercheurs (Lhota *et al.*, 2019b).

8.5 Conclusion

Pour assurer le maintien et la protection des espèces de primates non-humains sur Terre, il faut mettre rapidement en place des mesures de conservation ciblées (Estrada *et al.*, 2017). Pour le faire de manière adéquate, il est indispensable d'identifier et de comprendre les besoins écologiques de ces espèces menacées au sein des habitats perturbés dans lesquels elles tentent de survivre. A l'aide de méthodes non-invasives variées – observations éco-éthologiques à distance, analyses génétiques, fécales ou encore nutritionnelles – notre thèse de doctorat a contribué à l'amélioration des connaissances sur l'écologie alimentaire du nasique, *Nasalis larvatus*, une espèce de colobiné menacée par la perte et la fragmentation rapides de ses habitats. Mettant en évidence le rôle inattendu de cette espèce de primate dans la dispersion des graines, ce travail souligne l'importance de futures recherches qui se pencheront sur le rôle que peuvent jouer les colobinés dans la régénération des forêts. Ces données écologiques sont pertinentes pour les projets de restauration des habitats dégradés, ainsi que les programmes d'éducation et de sensibilisation à la conservation de la biodiversité. Finalement, notre étude confirme la nécessité de protéger et réhabiliter les zones riveraines afin d'assurer la conservation de *N. larvatus* et de ses habitats, recommandant la plantation d'espèces végétales-clés lors des programmes de restauration des zones dégradées.

9 Références bibliographiques



© Valentine Thiry

- Abrahamson, W.G. 1989. Plant-animal interactions: An overview. In: *Plant-animal interactions* (W. G. Abrahamson, ed), pp. 1–22. McGraw Hill, New York.
- Abram, N.K., Xofis, P., Tzanopoulos, J., MacMillan, D.C., Ancrenaz, M., Chung, R., *et al.* 2014. Synergies for improving oil palm production and forest conservation in floodplain landscapes. *PLoS One* **9**: e95388.
- Alamgir, M., Campbell, M.J., Sloan, S., Suhardiman, A., Supriatna, J. & Laurance, W.F. 2019. High-risk infrastructure projects pose imminent threats to forests in Indonesian Borneo. *Sci. Rep.* **9**:140: 1–10.
- Albert, A., Hambuckers, A., Culot, L., Savini, T. & Huynen, M.-C. 2013. Frugivory and seed dispersal by Northern pigtailed macaques (*Macaca leonina*), in Thailand. *Int. J. Primatol.* **34**: 170–193.
- Allaby, M. & Garrat, R. 2006. *Biomes of the Earth. Tropical forests*. Chelsea House.
- Almeida-Rocha, J.M. de, Peres, C.A. & Oliveira, L.C. 2017. Primate responses to anthropogenic habitat disturbance: A pantropical meta-analysis. *Biol. Conserv.* **215**: 30–38.
- Altmann, J. 1974. Observational study of behavior: Sampling methods. *Behaviour* **49**: 227–267.
- Amato, K.R. & Estrada, A. 2010. Seed dispersal patterns in two closely related howler monkey species (*Alouatta palliata* and *A. pigra*): A preliminary report of differences in fruit consumption, traveling behavior, and associated dung beetle assemblages. *Neotrop. Primates* **17**: 59–66.
- Ancrenaz, M., Goossens, B., Gimenez, O., Sawang, A. & Lackman-Ancrenaz, I. 2004. Determination of ape distribution and population size using ground and aerial surveys: a case study with orang-utans in lower Kinabatangan, Sabah, Malaysia. *Anim. Conserv.* **7**: 375–385.
- Anderson, T.M. 2012. Plant-animal interactions. In: *Encyclopedia of biodiversity* (E. L. Simms, ed), pp. 298–301. Berkshire.
- Andresen, E. & Levey, D.J. 2004. Effects of dung and seed size on secondary dispersal, seed predation, and seedling establishment of rain forest trees. *Oecologia* **139**: 45–54.
- Arabatzis, A.A. & Gregoire, T.G. 1991. Ordered and unordered multinomial response models: an application to assess loblolly pine merchantability. *Can. J. For. Res.* **21**: 261–268.
- Arditti, J., Michaud, J.D. & Allison, P. O. 1981. Seed germination of North American orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia*, and *Platanthera*. *Bot. Gaz.* **142**: 442–453.
- Arthur, J.C. 1985. Deviation in development due to the use of unripe seeds. *Am. Nat.* **29**: 804–815.
- Atmoko, T. 2002. Conservation of proboscis monkey and their isolated habitat in Kuala Samboja, East Kalimantan. In: *International Conference of Indonesian Forestry Researchers (INAFOR)*, pp. 446–453. Bogor: Forestry Research and Development Agency Indonesia.
- Azmi, R. 1998. *Natural vegetation of the Kinabatangan Floodplain. Part 1: An introduction to its natural vegetation, including a preliminary plant checklist of the region*. WWF-Malaysia.
- Barnea, A., Yom-Tov, Y. & Friedman, J. 1990. Differential germination of two closely related species of *Solanum* in response to bird ingestion. *Oikos* **57**: 222–228.
- Barnea, A., Yom-Tov, Y. & Friedman, J. 1992. Effect of frugivorous birds on seed dispersal and germination of multi-seeded fruits. *Acta Oecologica* **13**: 209–219.
- Barnett, A.A., Boyle, S.A., Pinto, L.P., Lourenc, W.C., Almeida, T., Silva, W.S., *et al.* 2012. Primary seed dispersal by three Neotropical seed-predating primates (*Cacajao melanocephalus ouakary*, *Chiropotes chiropotes* and *Chiropotes albinasus*). *J. Trop. Ecol.* **28**: 543–555.
- Barnosky, A.D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G.O.U., Swartz, B., Quental, T.B., *et al.* 2011. Has the Earth’s sixth mass extinction already arrived? *Nature* **471**: 51–57. Nature Publishing Group.
- Bauchop, T. & Martucci, R.W. 1968. Ruminant-like digestion of the langur monkey. *Sci. New Ser.* **161**: 698–700.
- Bawa, K.S., Ashton, P.S., Primack, R.B., Terborgh, J., Mohd. Nor, S., Ng, F.S.P., *et al.* 1989. *Reproductive ecology of tropical forest plants: Research insights and management implications*.
- Beaune, D., Bretagnolle, F., Bollache, L., Hohmann, G., Surbeck, M. & Fruth, B. 2013. Seed dispersal strategies and the threat of defaunation in a Congo forest. *Biodivers. Conserv.* **22**: 225–238.
- Bennett, E.L. 1986. Proboscis monkeys in Sarawak: Their ecology, status, conservation and management.
- Bennett, E.L., Nyaoi, A.J. & Sompud, J. 2000. Saving Borneo’s bacon: The sustainability of hunting in Sarawak and Sabah. In: *Hunting for Sustainability in Tropical Forests* (J. B. Robinson & E. L. Bennett, eds), pp. 305–324. Columbia University Press.
- Bennett, E.L. & Sebastian, A.C. 1988. Social organization and ecology of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in mixed coastal forest in Sarawak. *Int. J. Primatol.* **9**: 233–255.
- Berchielli, T.T., Sader, A.P. de O., Tonani, F.L., Paziani, S. de F. & Andrade, P. de. 2001. Use of the ANKOM system to determine neutral detergent fiber and acid detergent fiber with different filter bags and sample amounts. *Rev. Bras. Zootec.* **30**: 1572–1578.
- Bernard, H., Matsuda, I., Hanya, G. & Ahmad, A.H. 2011. Characteristics of night sleeping trees of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, Malaysia. *Int. J. Primatol.* **32**: 259–267.
- Bernard, H., Matsuda, I., Hanya, G., Phua, M.-H., Oram, F. & Ahmad, A.H. 2019. Feeding ecology of the proboscis monkey in Sabah, Malaysia, with special reference to plant species-poor forests. In: *Primates in flooded habitats: Ecology and conservation* (K. Nowak, A. A. Barnett, & I. Matsuda, eds), pp. 89–98.

- Cambridge University Press, Cambridge.
- Bertolino, S., di Montezemolo, N.C. & Bassano, B. 2009. Food-niche relationships within a guild of alpine ungulates including an introduced species. *J. Zool.* **277**: 63–69.
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B. & Moore, J.E. 1990. Digestive fermentation in herbivores: Effect of food particle size. *Physiol. Zool.* **63**: 710–721.
- Boland, D.J., Brooker, M.I.H., Chippendale, G.M., Hall, N., Hyland, B.P.M., Johnston, R.D., *et al.* 2006. *Forest trees of Australia*, 5th ed. CSIRO Publishing.
- Boom, A. 2015. Métabarcoding: mise en place d'outils dans le cadre de l'analyse du régime alimentaire du Bonobo (*Pan paniscus*). Université libre de Bruxelles.
- Boonratana, R. 2003. Feeding ecology of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in the Lower Kinabatangan, Sabah, Malaysia. *Sabah Park. Nat. J.* **6**: 1–26.
- Boonratana, R. 2013. Fragmentation and its significance on the conservation of proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) in the Lower Kinabatangan, Sabah (North Borneo). In: *Primates in fragments: complexity and resilience. Developments in Primatology: Progress and Prospects* (L. K. Marsh & C. A. Chapman, eds), pp. 459–474. Springer Sciences - Business Media, New York.
- Boonratana, R. 2000. Ranging behavior of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in the Lower Kinabatangan, Northern Borneo. *Int. J. Primatol.* **21**: 497–518.
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P. & Coissac, E. 2016. OBITools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* **16**: 176–182.
- Bradley, B.J., Stiller, M., Doran-Sheehy, D.M., Harris, T., Chapman, C.A., Vigilant, L., *et al.* 2007. Plant DNA sequences from feces: Potential means for assessing diets of wild primates. *Am. J. Primatol.* **69**: 699–705.
- Brodie, J.F., Giordano, A.J., Zipkin, E.F., Bernard, H., Mohd-azlan, J. & Ambu, L. 2015. Correlation and persistence of hunting and logging impacts on tropical rainforest mammals. *Conserv. Biol.* **29**: 110–121.
- Bryan, J.E., Shearman, P.L., Asner, G.P., Knapp, D.E., Aoro, G. & Lokes, B. 2013. Extreme differences in forest degradation in Borneo: Comparing practices in Sarawak, Sabah, and Brunei. *PLoS One* **8**: e69679.
- Buglione, M., Maselli, V., Rippa, D., Filippo, G. De, Trapanese, M. & Fulgione, D. 2018. A pilot study on the application of DNA metabarcoding for non-invasive diet analysis in the Italian hare. *Mamm. Biol.* **88**: 31–42. Elsevier GmbH.
- Cadamuro, V.C., Bouakaze, C., Croze, M., Schiavinato, S., Tonasso, L., Gérard, P., *et al.* 2015. Determined about sex: Sex-testing in 45 primate species using a 2Y/1X sex-typing assay. *Forensic Sci. Int. Genet.* **14**: 96–107.
- Cameron, G.N., Kincaid, W.B. & Carnes, B.A. 1979. Experimental species removal: Temporal activity patterns of *Sigmodon hispidus* and *Reithrodontomys fulvescens*. *J. Mammal.* **60**: 195–197.
- Caughlin, T.T., Ferguson, J.M., Lichstein, J.W., Zuidema, P.A., Bunyavejchewin, S. & Levey, D.J. 2014. Loss of animal seed dispersal increases extinction risk in a tropical tree species due to pervasive negative density dependence across life stages. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **282**: 20142095.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., Garcia, A., Pringle, R.M. & Palmer, T.M. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* **1**: e1400253–e1400253.
- Chapman, A.D. 2009. *Numbers of Living Species in Australia and the World*. Canberra.
- Chapman, C. & Russo, S.E. 2010. Primate seed dispersal. In: *Primates in Perspective* (C. J. Campbell, A. Fuentes, K. C. MacKinnon, S. K. Bearder, & R. M. Stumpf, eds), pp. 510–525. Oxford University Press.
- Chapman, C.A. 1995. Primate seed dispersal: Coevolution and conservation implications. *Evol. Anthropol. Issues, News, Rev.* **4**: 74–82.
- Chapman, C.A., Bonnell, T.R., Gogarten, J.F., Lambert, J.E., Omeja, P.A., Twinomugisha, D., *et al.* 2013. Are Primates Ecosystem Engineers? *Int. J. Primatol.* **34**: 1–14.
- Chapman, C.A. & Chapman, L.J. 2002. Foraging challenges of red colobus monkeys: Influence of nutrients and secondary compounds. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **133**: 861–875.
- Chapman, C.A., Chapman, L.J., Naughton-Treves, L., Lawes, M.J. & McDowell, L.R. 2004. Predicting folivorous primate abundance: Validation of a nutritional model. *Am. J. Primatol.* **62**: 55–69.
- Chapman, C.A., Chapman, L.J., Rode, K.D., Hauck, E.M. & McDowell, L.R. 2003. Variation in the nutritional value of primate foods: Among trees, time periods, and areas. *Int. J. Primatol.* **24**: 317–333.
- Chapman, C.A. & Dunham, A.E. 2018. Primate seed dispersal and forest restoration : An African perspective for a brighter future. *Int. J. Primatol.* **39**: 427–442. International Journal of Primatology.
- Chazdon, R.L. 2014. *Second growth: The promise of tropical forest regeneration in an age of deforestation*. University of Chicago Press.
- Chen, H. 2018. VennDiagram: Generate high-resolution venn and euler plots. R package version 1.6.20.
- Chen, Y., Chen, H., Zhang, Y., Yao, H., Yang, W., Zhao, Y., *et al.* 2018. First evidence of epizoochorous seed dispersal by golden snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) in temperate forest. *Plant Ecol.* **219**: 417–427. Springer Netherlands.
- Cheyne, S.M., Höing, A., Rinear, J. & Sheeran, L.K. 2012. Sleeping site selection by agile gibbons: The influence of tree stability, fruit availability and predation risk. *Folia Primatol.* **83**: 299–311.

- Chivers, D.J. 1994. Functional anatomy of the gastrointestinal tract. In: *Colobine Monkeys: Their Ecology, Behaviour, and Evolution* (A. G. Davies & J. F. Oates, eds), pp. 205–228. Cambridge University Press.
- CITES. 2015. *CITES Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora Appendices I, II, and III*. Geneva, Switzerland.
- CITES. 1973. *Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction*. Washington.
- Clauss, M., Lechner-Doll, M. & Streich, W.J. 2002. Faecal particle size distribution in captive wild ruminants: An approach to the browser/grazer dichotomy from the other end. *Oecologia* **131**: 343–349.
- Clauss, M., Steuer, P., Erlinghagen-Lückerath, K., Kaandorp, J., Fritz, J., Südekum, K.-H., et al. 2015. Faecal particle size: Digestive physiology meets herbivore diversity. *Comp. Biochem. Physiol. A* **179**: 182–191.
- Coley, P.D. & Aide, T.M. 1991. Comparison of herbivory and plant defences in temperate and tropical broad-leaved forests. In: *Plant–animal interactions: Evolutionary ecology in tropical and temperate regions* (P. W. Price, T. M. Lewinsohn, G. W. Fernandes, & W. W. Benson, eds), pp. 25–49. John Wiley & Sons, Inc.
- Connell, J.H., Tracey, J.G. & Webb, L.J. 1984. Compensatory recruitment, growth, and mortality as factors maintaining rain forest tree diversity. *Ecol. Monogr.* **54**: 141–164.
- Corlett, R.T. 1998. Frugivory and seed dispersal by vertebrates in the Oriental (Indomalayan) Region. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **73**: 413–448.
- Corlett, R.T. 2017. Frugivory and seed dispersal by vertebrates in tropical and subtropical Asia: An update. *Glob. Ecol. Conserv.* **11**: 1–22.
- Corlett, R.T. & Hau, B.C.H. 2000. Seed dispersal and forest restoration. *For. Restor. Wildl. Conserv.* 317–325.
- Corlett, R.T. & Lucas, P.W. 1990. Alternative seed-handling strategies in primates: seed-spitting by long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Oecologia* **82**: 166–171.
- Costello, M.J., May, R.M. & Stork, N.E. 2013. Can we name Earth's species before they go extinct? *Science* (80-.). **339**: 413–416.
- Cristóbal-Azkarate, J. & Arroyo-Rodríguez, V. 2007. Diet and activity pattern of howler monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, Mexico: Effects of habitat fragmentation and implications for conservation. *Am. J. Primatol.* **69**: 1013–1029.
- Cruz-Tejada, Di.M., Acosta-Rojas, D.C. & Stevenson, P.R. 2018. Are seeds able to germinate before fruit color ripening? Evidence from six Neotropical bird-dispersed plant species. *Ecosphere* **9**: e02174.
- Culot, L. 2009. Primary seed dispersal by two sympatric species of tamarins, *Saguinus fuscicollis* and *Saguinus mystax*, and post-dispersal seed fate. Université de Liège.
- Culot, L., Muñoz Lazo, F.J.J., Huynen, M.-C., Poncin, P. & Heymann, E.W. 2010. Seasonal variation in seed dispersal by tamarins alters seed rain in a secondary rain forest. *Int. J. Primatol.* **31**: 553–569.
- Curran, L.M., Trigg, S.N., McDonald, A.K., Astiani, D., Hardiono, Y.M., Siregar, P., et al. 2004. Lowland forest loss in protected areas of Indonesian Borneo. *Science* (80-.). **303**: 1000–1003.
- Darman, H. 2014. Physiography of Indonesia. In: *Geology of Indonesia* (van Bemmelen, ed).
- Dasilva, G.L. 1994. Diet of *Colobus polykomos* on Tiwai island: Selection of food in relation to its seasonal abundance and nutritional quality. *Int. J. Primatol.* **15**: 655–680.
- Davies, A.G. & Baillie, I.C. 1988. Soil-eating by red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*) in Sabah, Northern Borneo. *Biotropica* **20**: 252–258.
- Davies, A.G., Bennett, E.L. & Waterman, P.G. 1988. Food selection by two South-east Asian colobine monkeys (*Presbytis rubicunda* and *Presbytis melalophos*) in relation to plant chemistry. *Biol. J. Linn. Soc.* **34**: 33–56.
- De Barba, M., Miquel, C., Boyer, F., Mercier, C., Rioux, D., Coissac, E., et al. 2014. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: Application to omnivorous diet. *Mol. Ecol. Resour.* **14**: 306–323.
- Deagle, B.E., Eveson, J.P. & Jarman, S.N. 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces Bruce. *Front. Zool.* **3**: 1–10.
- Deagle, B.E., Thomas, A.C., Shaffer, A.K., Trites, A.W. & Jarman, S.N. 2013. Quantifying sequence proportions in a DNA-based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: Which counts count? *Mol. Ecol. Resour.* **13**: 620–633.
- Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., et al. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* **26**: 5872–5895.
- Di Cerbo, A.R. & Biancardi, C.M. 2012. Monitoring small and arboreal mammals by camera traps: Effectiveness and applications. *Acta Theriol. (Warsz)*. **58**: 279–283.
- Dirzo, R., Young, H.S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N.J.B. & Collen, B. 2014. Defaunation in the Anthropocene. *Science* (80-.). **345**: 401–406.
- Dominy, N.J. & Lucas, P.W. 2001. Ecological importance of trichromatic vision to primates. *Nature* **410**: 363–366.
- Dove, H. & Wayes, R.W. 1996. Plant wax components: A new approach to estimating intake and diet composition

- in herbivores. *J. Nutr.* **126**: 13–26.
- Dunbar, R.I.M. & Bose, U. 1991. Adaptation to grass-eating in gelada baboons. *Primates* **32**: 1–7.
- Dunham, N.T. & Lambert, A.L. 2016. The role of leaf toughness on foraging efficiency in Angola black and white colobus monkeys (*Colobus angolensis palliatus*). *Am. J. Phys. Anthropol.* **161**: 343–354.
- Ehlers Smith, D.A., Husson, S.J., Ehlers Smith, Y.C. & Harrison, M.E. 2013. Feeding ecology of red langurs in Sabangau tropical peat-swamp forest, Indonesian Borneo: Extreme granivory in a non-masting forest. *Am. J. Primatol.* **9999**: 1–12.
- Ehrlich, P.R. & Pringle, R.M. 2008. Where does biodiversity go from here? A grim business-as-usual forecast and a hopeful portfolio of partial solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 11579–11586.
- Erikson, O. & Ehrlén, J. 2008. Seedling recruitment and population ecology. In: *Seedling ecology and evolution* (M. A. Leck, V. T. Parker, & R. L. Simpson, eds), pp. 239–254. Cambridge University Press.
- Estes, J.G., Othman, N., Ismail, S., Ancrenaz, M., Goossens, B., Ambu, L.N., *et al.* 2012. Quantity and configuration of available elephant habitat and related conservation concerns in the Lower Kinabatangan Floodplain of Sabah, Malaysia. *PLoS One* **7**.
- Estrada, A., Garber, P.A., Rylands, A.B., Roos, C., Fernandez-Duque, E., Fiore, A. Di, *et al.* 2017. Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. *Sci. Adv.* **3**.
- European Commission. 2018. *Larger than tigers: Inputs for a strategic approach to biodiversity conservation in Asia*. Brussels.
- Evenari, M. 1949. Germination inhibitors. *Bot. Rev.* **15**: 153–194.
- FAO. 2015. *Évaluation des ressources forestières mondiales: Comment les forêts de la planète changent-elles?* Rome.
- FAO. 2016. *Situation des forêts du monde. Forêts et agriculture: Défis et possibilités concernant l'utilisation des terres*.
- Farwig, N. & Berens, D.G. 2012. Imagine a world without seed dispersers: A review of threats, consequences and future directions. *Basic Appl. Ecol.* **13**: 109–115.
- Fashing, P.J., Dierenfeld, E.S. & Mowry, C.B. 2007. Influence of plant and soil chemistry on food selection, ranging patterns, and biomass of *Colobus guereza* in Kakamega forest, Kenya. *Int. J. Primatol.* **28**: 673–703.
- Feilen, K.L. & Marshall, A.J. 2014. Sleeping site selection by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in West Kalimantan, Indonesia. *Am. J. Primatol.* **76**: 1127–1139.
- Felton, A.M., Felton, A., Foley, W.J. & Lindenmayer, D.B. 2010. The role of timber tree species in the nutritional ecology of spider monkeys in a certified logging concession, Bolivia. *For. Ecol. Manage.* **259**: 1642–1649. Elsevier B.V.
- Ficetola, G.F., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessière, J., *et al.* 2010. An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics* **11**.
- Ficetola, G.F., Manenti, R. & Taberlet, P. 2019. Environmental DNA and metabarcoding for the study of amphibians and reptiles: species distribution, the microbiome, and much more. *Amphib. Reptil.* **40**: 129–148.
- Fischer, J. & Lindenmayer, D.B. 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **16**: 265–280.
- Fitzherbert, E.B., Struebig, M.J., Morel, A., Danielsen, F., Brühl, C.A., Donald, P.F., *et al.* 2008. How will oil palm expansion affect biodiversity? *Trends Ecol. Evol.* **23**: 538–545.
- Foley, W.J., McIlwee, A., Lawler, I., Aragonés, L., Woolnough, A.P. & Berding, N. 1998. Ecological applications of near infrared reflectance spectroscopy - a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance. *Oecologia* **116**: 293–305.
- Foster, M.S. 1977. Ecological and nutritional effects of food scarcity on a tropical frugivorous bird and its fruit source. *Ecology* **58**: 73–85.
- Fox, J. & Weisberg, S. 2011. *An R companion to applied regression*, second edition. Thousand Oaks, CA: Sage.
- Fritz, J., Hummel, J., Kienzle, E., Arnold, C., Nunn, C. & Clauss, M. 2009. Comparative chewing efficiency in mammalian herbivores. *Oikos* **118**: 1623–1632.
- Fritz, J., Streich, W.J., Schwarm, A. & Clauss, M. 2012. Condensing results of wet sieving analyses into a single data: A comparison of methods for particle size description. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* **96**: 783–797.
- Ganzhorn, J.U. 2002. Distribution of a folivorous lemur in relation to seasonally varying food resources: Integrating quantitative and qualitative aspects of food characteristics. *Oecologia* **131**: 427–435.
- Ganzhorn, J.U. 1995. Low-level forest disturbance effects on primary production, leaf chemistry, and lemur populations. *Ecology* **76**: 2084–2096.
- Garber, P. a & Lambert, J.E. 1998. Primates as seed dispersers: Ecological processes and directions for future research. *Am. J. Primatol.* **45**: 3–8.
- Gaulin, S.J.C. 1979. A Jarman/Bell model of primate feeding niches. *Hum. Ecol.* **7**: 1–20.

- Gaveau, D.L. a, Sloan, S., Molidena, E., Yaen, H., Sheil, D., Abram, N.K., *et al.* 2014. Four decades of forest persistence, clearance and logging on Borneo. *PLoS One* **9**: 1–11.
- Gaveau, D.L.A., Kshatriya, M., Sheil, D., Sloan, S., Molidena, E., Wijaya, A., *et al.* 2013. Reconciling forest conservation and logging in Indonesian Borneo. *PLoS One* **8**: e69887.
- Gaveau, D.L.A., Sheil, D., Husnayaen, Salim, M.A., Arjasakusuma, S., Ancrenaz, M., *et al.* 2016. Rapid conversions and avoided deforestation: Examining four decades of industrial plantation expansion in Borneo. *Sci. Rep.* **6**: 1–13. Nature Publishing Group.
- Geist, H.J. & Lambin, E.F. 2001. *What Drives Tropical Deforestation ?* Louvain-la-Neuve.
- Gibbs, H.K., Ruesch, A.S., Achard, F., Clayton, M.K., Holmgren, P., Ramankutty, N., *et al.* 2010. Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 16732–16737.
- Gokkon, B. 2019. Indonesia picks coal and oil heartland as site of new capital city.
- Goossens, B. 2019. *Jungle Times*.
- Gould, E. 1978. Foraging behavior of Malaysian nectar-feeding bats. *Biotropica* **10**: 184–193.
- Graipel, M., Miller, P. & Glock, L. 2003. Padrão de atividade de Akodon motensis e Oryzomys russatus na Reserva Volta Velha, Santa Catarina, Sul do Brasil. *Mastozool. Neotrop.* **10**: 255–260.
- Greenpeace. 2012. *Palm oil's new frontier*. Amsterdam.
- Gregory, T., Rueda, F.C., Deichmann, J., Kolowski, J. & Alonso, A. 2014. Arboreal camera trapping: Taking a proven method to new heights. *Methods Ecol. Evol.* **5**: 443–451.
- Griffiths, C.J., Hansen, D.M., Jones, C.G., Zuël, N. & Harris, S. 2011. Resurrecting extinct interactions with extant substitutes. *Curr. Biol.* **21**: 762–765.
- Hahn, M.B., Epstein, J.H., Gurley, E.S., Islam, M.S., Luby, S.P., Daszak, P., *et al.* 2014. Roosting behaviour and habitat selection of *Pteropus giganteus* reveal potential links to Nipah virus epidemiology. *J. Appl. Ecol.* **51**: 376–387.
- Hai, T.C., Ng, A., Prudente, C., Pang, C. & Tek Choon Yee, J. 2001. Balancing the need for sustainable oil palm development and conservation : The Lower Kinabatangan Floodplains experience. In: *ISP National Seminar 2001: Strategic Directions for the Sustainability of the Oil Palm Industry*, pp. 1–53. Kota Kinabalu.
- Hambali, K., Ismail, A. & Md-zain, B.M. 2012. Daily activity budget of long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) in Kuala Selangor Nature Park. *Int. J. Basic Appl. Sci.* **12**: 47–52.
- Hanya, G. & Bernard, H. 2015. Different roles of seeds and young leaves in the diet of red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*): Comparisons of availability, nutritional properties, and associated feeding behavior. *Int. J. Primatol.* **36**: 177–193.
- Hanya, G. & Bernard, H. 2012. Fallback foods of red leaf monkeys (*Presbytis rubicunda*) in Danum Valley, Borneo. *Int. J. Primatol.* **33**: 322–337.
- Hanya, G., Kiyono, M., Takafumi, H., Tsujino, R. & Agetsuma, N. 2007. Mature leaf selection of Japanese macaques: Effects of availability and chemical content. *J. Zool.* **273**: 140–147.
- Harrison, R.D., Tan, S., Plotkin, J.B., Slik, F., Detto, M., Brenes, T., *et al.* 2013. Consequences of defaunation for a tropical tree community. *Ecol. Lett.* **16**: 687–694.
- Herald, T.J., Gadgil, P., Perumal, R., Bean, S.R. & Wilson, J.D. 2014. High-throughput micro-plate HCl-vanillin assay for screening tannin content in sorghum grain. *J. Sci. Food Agric.* **94**: 2133–2136.
- Herrera, C.M. 2002. Seed dispersal by vertebrates. In: *Plant-animal interactions: An evolutionary approach* (C. M. Herrera & O. Pellmyr, eds), pp. 185–208.
- Heymann, E.W. 2011. Florivory, nectarivory, and pollination - A review of primate-flower interactions. *Ecotropica* **17**: 41–52.
- Hibert, F., Taberlet, P., Chave, J., Scotti-Saintagne, C., Sabatier, D. & Richard-Hansen, C. 2013. Unveiling the diet of elusive rainforest herbivores in next generation sequencing era? The tapir as a case study. *PLoS One* **8**: e60799.
- Hill, D.A. & Lucas, P.W. 1996. Toughness and fiber content of major leaf foods of Japanese macaques (*Macaca fuscata yakui*) in Yakushima. *Am. J. Primatol.* **38**: 221–231.
- Hodgkison, R., Balding, S.T., Zubaid, A. & Kunz, T.H. 2003. Fruit bats (Chiroptera: Pteropodidae) as seed dispersers and pollinators in a lowland Malaysian rain forest. *Biotropica* **35**: 491–502.
- Holechek, J.L., Vavra, M. & Pieper, R.D. 1982. Botanical composition determination of range herbivore diets: A review. *J. range Manag.* **35**: 309–315.
- Horton, A.J., Constantine, J.A., Hales, T.C., Goossens, B., Bruford, M.W. & Lazarus, E.D. 2017. Modification of river meandering by tropical deforestation. *Geology* **45**: 511–514.
- Howe, H.E. & Smallwood, J. 1982. Ecology of seed dispersal. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **13**: 201–228.
- Howe, H.F. 2016. Making dispersal syndromes and networks useful in tropical conservation and restoration. *Glob. Ecol. Conserv.* **6**: 152–178. Elsevier B.V.
- Hulme, P.E. 2002. Seed-eaters: Seed dispersal, destruction and demography. In: *Seed dispersal and frugivory: Ecology, evolution and conservation* (D. J. Levey, W. R. Silva, & M. Galetti, eds), pp. 257–273. CABI

- Publishing.
- Hutan. 2018. *Kinabatangan Orang-utan Conservation Programme - Annual report*.
- Hutan. 2019. Reforestation project.
- Irwin, M.T. 2016. Habitat change: loss, fragmentation, and degradation. In: *An introduction to primate conservation* (S. A. Wich & A. J. Marshall, eds), pp. 111–128. Oxford University Press.
- IUCN. 2019. The IUCN red list of threatened species. Version 2019-2.
- Jansen, P.A. & Ouden, J. den. 2005. Observing seed removal: remote video monitoring of seed selection, predation and dispersal. In: *Seed fate: predation, dispersal and seedling establishment* (P.-M. Forget, J. E. Lambert, P. E. Hulme, & S. B. Vander Wall, eds), pp. 363–378. CABI Publishing.
- Janson, C.H. 1988. Intra-specific food competition and primate social structure: A synthesis. *Behaviour* **105**: 1–17.
- Janson, C.H. & Chapman, C.A. 1999. Resources and primate community structure. In: *Primate communities* (J. G. Fleagle, C. H. Janson, & K. E. Reed, eds), pp. 237–267. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Janzen, D.H. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *Am. Soc. Nat.* **104**: 501–528.
- Jones, J.H. 2011. Primates and the evolution of long-slow life histories. *Curr. Biol.* **21**: 708–717.
- Kaneko, H. & Lawler, I.R. 2006. Can near infrared spectroscopy be used to improve assessment of marine mammal diets via fecal analysis? *Mar. Mammal Sci.* **22**: 261–275.
- Kanowski, J., Catterall, C.P., Dennis, A.J. & Westcott, D.A. 2004. *Animal-plant interactions in rainforest conservation and restoration*. Cooperative Research Centre for Tropical Rainforest Ecology and Management. Rainforest CRC, Cairns.
- Kanwatanakid-Savini, C. on, Poonswad, P. & Savini, T. 2009. An assessment of food overlap between gibbons and hornbills. *Raffles Bull. Zool.* **57**: 189–198.
- Kartzinel, T.R., Chen, P.A., Coverdale, T.C., Erickson, D.L., Kress, W.J., Kuzmina, M.L., *et al.* 2015. DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African large herbivores. **112**.
- Kassambara, A., Kosinski, M., Biecek, P. & Fabian, S. 2017. Package ‘survminer’: Drawing survival curves using “ggplot2.”
- Kawabe, M. & Mano, T. 1972. Ecology and behavior of the wild proboscis monkey, *Nasalis larvatus* (Wurmb), in Sabah, Malaysia. *Primates* **13**: 213–227.
- Kay, R.N.B., Hoppe, I. P. & Maloy, G.M.O. 1976. Fermentative Digestion of Food in the Colobus Monkey, *Colobus polykomos*. *Experientia* **32**: 485–487.
- Kern, J.A. 1964. Observations on the habits of the proboscis monkey, *Nasalis larvatus* (Wurmb), made in the Brunei Bay area, Borneo. *Zoologica* **49**: 183–192.
- Kettle, C.J., Ghazoul, J., Ashton, P., Cannon, C.H., Chong, L., Diway, B., *et al.* 2011. Seeing the fruit for the trees in Borneo. *Conserv. Lett.* **4**: 184–191.
- Koh, L.P. & Wilcove, D.S. 2008. Is oil palm agriculture really destroying tropical biodiversity? *Conserv. Lett.* **1**: 60–64.
- Kolbert, E. 2014. *La sixième extinction: Comment l’homme détruit la vie* (Vuibert, ed).
- Kool, K.M. 1992. Food selection by the silver leaf monkey, *Trachypithecus auratus sondaicus*, in relation to plant chemistry. *Oecologia* **90**: 527–533.
- Kopel. 2019. Forest habitat restoration - tree planting: Kinabatangan, Sabah, Malaysian Borneo.
- Kunz, B.T.H. & Jones, D.P. 2000. *Pteropus vampyrus*. *Mamalian Species* 1–6.
- Lackman-Ancrenaz, I., Ancrenaz, M. & Saburi, R. 2001. The Kinabatangan Orangutan Conservation Project (KOCPP). In: *The Apes: Challenges for the 21st Century*, pp. 262–265. Brookfield Zoo.
- Lambert, J.E. 2010. Primate nutritional ecology: Feeding biology and diet at ecological and evolutionary scales. In: *Primates in perspective* (C. J. Campbell, A. Fuentes, K. C. MacKinnon, S. K. Bearder, & R. M. Stumpf, eds), pp. 512–522. Oxford University Press, Oxford.
- Laurance, W.F. 2007. Have we overstated the tropical biodiversity crisis? *Trends Ecol. Evol.* **22**: 65–70.
- Laurance, W.F. 1999. Reflections on the tropical deforestation crisis. *Biol. Conserv.* **91**: 109–117.
- Laurance, W.F., Sayer, J. & Cassman, K.G. 2014. Agricultural expansion and its impacts on tropical nature. *Trends Ecol. Evol.* **29**: 107–116.
- Leite, Y.L.R., Costa, L.P. & Stallings, J.R. 2013. Diet and vertical space use of three sympatric opossums in a Brazilian Atlantic forest reserve. *J. Trop. Ecol.* **12**: 435–440.
- Lenton, M.L. 1984. The feeding and breeding ecology of barn owls *Tyto alba* in Peninsular Malaysia. *Ibis (Lond. 1859)*. **126**: 551–575.
- Lhota, S., Scott, K.S.S. & Sha, J.C.M. 2019a. Primates in flooded forests of Borneo: Opportunities and challenges for ecotourism as a conservation strategy. In: *Primates in flooded habitats: Ecology and conservation* (K. Nowak, A. A. Barnett, & I. Matsuda, eds), pp. 331–340. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lhota, S., Sha, J.C.M., Bernard, H. & Matsuda, I. 2019b. Proboscis Monkey Conservation: Beyond the Science. In: *Primate Research and Conservation in the Anthropocene* (A. M. Behie, J. A. Teichroeb, & N. Malone, eds), pp. 182–196. Cambridge University Press, Cambridge.

- Lim, T.K. 2013. *Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 5, Fruits*. Springer, New York.
- Loiselle, B.A. 1990. Seeds in droppings of tropical fruit-eating birds: importance of considering seed composition. *Oecologia* **82**: 494–500.
- MacKinnon, K., Hatta, G., Halim, H. & Mangalik, A. 1996. *The Ecology of Kalimantan: Indonesian Borneo*, Periplus E.
- Maddox, T., Priatna, D., Gemita, E. & Salampessy, A. 2007. *The conservation of tigers and other wildlife in oil palm plantations - Jambi province, Sumatra, Indonesia*. London.
- Maisels, F., Gautier-Hion, A. & Gautier, J.-P. 1994. Diets of two sympatric colobines in Zaire: More evidence on seed-eating in forests on poor soils. *Int. J. Primatol.* **15**: 681–701.
- Martin, P. 2008. Influence de la fragmentation forestière sur la régénération des espèces arborées dans le Sud-Ouest de la Côte d'Ivoire. Université de Genève.
- Matsuda, I. 2008. Feeding and Ranging Behaviors of Proboscis Monkey *Nasalis larvatus* in Sabah, Malaysia. Hokkaido University.
- Matsuda, I., Abram, N.K., Stark, D.J., Sha, J.C.M., Ancrenaz, M., Goossens, B., *et al.* 2018. Population dynamics of the proboscis monkey *Nasalis larvatus* in the Lower Kinabatangan, Sabah, Borneo, Malaysia. *Oryx*, doi: 10.1017/S0030605318000467.
- Matsuda, I., Akiyama, Y., Tuuga, A., Bernard, H. & Clauss, M. 2014a. Daily feeding rhythm in proboscis monkeys: A preliminary comparison with other non-human primates. *Primates* **55**: 313–326.
- Matsuda, I., Chapman, C.A. & Clauss, M. 2019a. Colobine forestomach anatomy and diet. *J. Morphol.* 1–9.
- Matsuda, I., Clauss, M., Tuuga, A., Sugau, J., Hanya, G., Yumoto, T., *et al.* 2017. Factors affecting leaf selection by foregut-fermenting proboscis monkeys: New insight from in vitro digestibility and toughness of leaves. *Sci. Rep.* **7**: 1–10. Nature Publishing Group.
- Matsuda, I., Higashi, S., Otani, Y., Tuuga, A., Bernard, H. & Corlett, R.T. 2013a. A short note on seed dispersal by colobines: The case of the proboscis monkey. *Integr. Zool.* **8**: 395–399.
- Matsuda, I., Kubo, T., Tuuga, A. & Higashi, S. 2010. A bayesian analysis of the temporal change of local density of proboscis monkeys: Implications for environmental effects on a multilevel society. *Am. J. Phys. Anthropol.* **142**: 235–245.
- Matsuda, I., Murai, T., Clauss, M., Yamada, T., Tuuga, A., Bernard, H., *et al.* 2011a. Regurgitation and remastication in the foregut-fermenting proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Biol. Lett.* **7**: 786–789.
- Matsuda, I., Nakabayashi, M., Otani, YosukeWai, Y.S., Tuuga, A., Wong, A., Bernard, H., *et al.* 2019b. Comparison of plant diversity and phenology of riverine and mangrove forests with those of the dryland forest in Sabah, Borneo, Malaysia. In: *Primates in flooded habitats: Ecology and conservation* (K. Nowak, A. A. Barnett, & I. Matsuda, eds), pp. 15–28. Cambridge University Press, Cambridge.
- Matsuda, I., Sha, J.C.M., Ortmann, S., Schwarm, A., Grandl, F., Caton, J., *et al.* 2015. Excretion patterns of solute and different-sized particle passage markers in foregut-fermenting proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) do not indicate an adaptation for rumination. *Physiol. Behav.* **149**: 45–52.
- Matsuda, I., Tuuga, A., Akiyama, Y. & Higashi, S. 2008a. Selection of river crossing location and sleeping site by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, Malaysia. *Am. J. Primatol.* **70**: 1097–1101.
- Matsuda, I., Tuuga, A. & Bernard, H. 2011b. Riverine refuging by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) and sympatric primates: Implications for adaptive benefits of the riverine habitat. *Mamm. Biol.* **76**: 165–171.
- Matsuda, I., Tuuga, A., Bernard, H., Sugau, J. & Hanya, G. 2013b. Leaf selection by two Bornean colobine monkeys in relation to plant chemistry and abundance. *Sci. Rep.* **3**: 1–6.
- Matsuda, I., Tuuga, A., Hashimoto, C., Bernard, H., Yamagiwa, J., Fritz, J., *et al.* 2014b. Faecal particle size in free-ranging primates supports a 'rumination' strategy in the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Oecologia* **174**: 1127–1137.
- Matsuda, I., Tuuga, A. & Higashi, S. 2008b. Clouded leopard (*Neofelis diardi*) predation on proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, Malaysia. *Primates* **49**: 227–231.
- Matsuda, I., Tuuga, A. & Higashi, S. 2009a. Ranging behavior of proboscis monkeys in a riverine forest with special reference to ranging in inland forest. *Int. J. Primatol.* **30**: 313–325.
- Matsuda, I., Tuuga, A. & Higashi, S. 2009b. The feeding ecology and activity budget of proboscis monkeys. *Am. J. Primatol.* **71**: 478–492.
- Mawah, S.S.H.A., Indim, D., Rahman, N.A.A. & Majid, S.N.B.A. 2015. Feeding ecology of proboscis monkey, *Nasalis larvatus* in Garama, Klias Peninsula, Sabah, Malaysia. *Malayan Nat. J.* **67**: 308–317.
- May, R.M. 2010. Ecological science and tomorrow's world. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **365**: 41–47.
- McCabe, G.M. & Fedigan, L.M. 2007. Effects of reproductive status on energy intake, ingestion rates, and dietary composition of female *Cebus capucinus* at Santa Rosa, Costa Rica. *Int. J. Primatol.* **28**: 837–851.
- McConkey, K.R. 2000. Primary seed shadow generated by gibbons in the rain forests of Barito Ulu, central Borneo. *Am. J. Primatol.* **52**: 13–29.
- McConkey, K.R. 2018. Seed dispersal by primates in Asian habitats: from species, to communities, to conservation. *Int. J. Primatol.* **39**: 466–492. International Journal of Primatology.

- McNair, J.N., Sunkara, A. & Frobish, D. 2012. How to analyse seed germination data using statistical time-to-event analysis: non-parametric and semi-parametric methods. *Seed Sci. Res.* **22**: 77–95.
- Medway, L. 1969. *Wild mammals of Malaya (Peninsular Malaysia) and Singapore*. Oxford University Press, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Meek, P., Ballard, G., Fleming, P. & Falzon, G. 2016. Are we getting the full picture ? Animal responses to camera traps and implications for predator studies. *Ecol. Evol.* **6**: 3216–3225.
- Meijaard, E. & Nijman, V. 2000a. Distribution and conservation of the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) in Kalimantan, Indonesia. *Biol. Conserv.* **92**: 15–24.
- Meijaard, E. & Nijman, V. 2003. Primate hotspots on Borneo: Predictive value for general biodiversity and the effects of taxonomy. *Conserv. Biol.* **17**: 725–732.
- Meijaard, E. & Nijman, V. 2000b. The local extinction of the proboscis monkey *Nasalis larvatus* in Pulau Kaget Nature Reserve, Indonesia. *Oryx* **34**: 66–70.
- Meijaard, E., Nijman, V. & Supriatna, J. 2008. *Nasalis larvatus*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Meyer, G.A. & Witmet, M.C. 1998. Influence of seed processing by frugivorous birds on germination success of three North American shrubs. *Am. Midl. Nat.* **140**: 129–139.
- Michiels, C. 2011. *L'huile de palme dans les échanges mondiaux: Enjeu stratégique et sujet de polémiques*.
- Mildenstein, T.L., Stier, S.C., Nuevo-diego, C.E. & Mills, L.S. 2005. Habitat selection of endangered and endemic large flying-foxes in Subic Bay, Philippines. *Biol. Conserv.* **126**: 93–102.
- Miller, L.E. 2002. *Eat or be eaten: Predator sensitive foraging among primates*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Milton, K. 1993. Diet and primate evolution. *Sci. Am.* **269**: 86–93.
- Milton, K. 1979. Factors influencing leaf choice by howler monkeys: A test of some hypotheses of food selection by generalist herbivores. *Am. Nat.* **114**: 362–378.
- Milton, K. 1998. Physiological ecology of howlers (*Alouatta*): Energetic and digestive considerations and comparison with the Colobinae. *Int. J. Primatol.* **19**: 513–548.
- Mittermeier, R.A. & Rylands, A.B. 2013. Family Cercopithecidae (Old World Monkeys). In: *Handbook of the Mammals of the World. Vol. 3. Primates* (R. A. Mittermeier, A. B. Rylands, & D. E. Wilson, eds), pp. 550–753. Barcelona.
- Moorhouse-Gann, R.J., Dunn, J.C., de Vere, N., Goder, M., Cole, N., Hipperson, H., et al. 2018. New universal ITS2 primers for high-resolution herbivory analyses using DNA metabarcoding in both tropical and temperate zones. *Sci. Rep.* **8**:8542: 1–15.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B. & Worm, B. 2011. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol.* **9**: 1–8.
- Moreno-Black, G. 1978. The use of scat samples in primate diet analysis. *Primates* **19**: 215–221.
- Morris, R.J. 2010. Anthropogenic impacts on tropical forest biodiversity: a network structure and ecosystem functioning perspective. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **365**: 3709–3718.
- Murai, T. 2006. Mating behaviors of the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Am. J. Primatol.* **68**: 832–837.
- Myers, N., Fonseca, G. a B., Mittermeier, R. a, Fonseca, G. a B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853–858.
- National Research Council. 2003. *Nutrient Requirements of Nonhuman Primates*. The National Academy Press, Washington DC.
- Neuschulz, E.L., Mueller, T., Schleuning, M. & Böhning-gaese, K. 2016. Pollination and seed dispersal are the most threatened processes of plant regeneration. *Sci. Rep.* **6**. Nature Publishing Group.
- Newbold, T., Hudson, L.N., Hill, S.L.L., Contu, S., Lysenko, I., Senior, R.A., et al. 2015. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature* **520**: 45–50.
- Nguyen, H., Bai, B., Li, N., Pan, Y. & Lu, C. 2013. Fruit diet, selectivity and seed dispersal of Hatinh langur (*Tachypithecus francoisi hatinhensis*). *Acta Ecol. Sin.* **33**: 110–119.
- Nijboer, J. 2006. Fibre intake and faeces quality in leaf-eating primates. Universiteit Utrecht.
- Nijboer, J. & Clauss, M. 2006. The digestive physiology of colobine primates. In: *Fibre intake and faeces quality in leaf-eating primates* (J. Nijboer, ed), pp. 9–28. University of Utrecht, The Netherlands.
- Norconk, M.A., Grafton, B.W. & Conklin-brittain, N.L. 1998. Seed dispersal by Neotropical seed predators. *Am. J. Primatol.* **45**: 103–126.
- Nsubuga, A.M., Robbins, M.M., Roeder, A.D., Morin, P.A., Boesch, C. & Vigilant, L. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Mol. Ecol.* **13**: 2089–2094.
- Nuar, E. & Lunkapis, G.J. 2019. Customary Land and the Indigenous People of Sabah: A Case Study of Sinumagang-Tinuman Toki. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **286**: 0–7.
- Nygren, K. & Hofmann, R.R. 1990. Seasonal variations of food particle size in Moose. *Alces* **26**: 44–50.
- O'Dowd, D.J. & Gill, A.M. 1986. Seed dispersal syndromes in Australian Acacia. In: *Seed dispersal* (D. R. Murray, ed), pp. 87–121. Academic Press.

- Oates, J.F. 1978. Water-plant and soil consumption by guereza monkeys (*Colobus guereza*): A relationship with minerals and toxins in the diet? *Biotropica* **10**: 241–253.
- Oates, J.F. & Davies, A.G. 1994. What are the colobines? In: *Colobine Monkeys: Their Ecology, Behaviour, and Evolution* (A. G. Davies & J. F. Oates, eds), pp. 1–10. Cambridge University Press.
- Oates, J.F., Davies, A.G. & Delson, E. 1994. The diversity of living colobines. In: *Colobine Monkeys: Their Ecology, Behaviour, and Evolution* (A. G. Davies & J. F. Oates, eds), pp. 45–74. Cambridge University Press.
- Oates, J.F., Waterman, P.G. & Choo, G.M. 1980. Food selection by the South Indian leaf-monkey, *Presbytis johnii*, in relation to leaf chemistry. *Oecologia* **45**: 45–56.
- Oftedal, O.T., Whiten, A., Southgate, D.A.T. & Soest, P. Van. 1991. The nutritional consequences of foraging in primates: The relationship of nutrient intakes to nutrient requirements. *Philos. Trans. Biol. Sci.* **334**: 161–170.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., *et al.* 2017. vegan: community ecology package. R package version 2.4-4.
- Oliveira-Santos, L.G.R., Tortato, M.A. & Graipel, M.E. 2013. Activity pattern of Atlantic forest small arboreal mammals as revealed by camera traps. *J. Trop. Ecol.* **24**: 563–567.
- Ortmann, S., Bradley, B., Stolter, C. & Ganzhorn, J.U. 2006. Estimating the quality and composition of wild animal diets: a critical survey of methods. In: *Feeding ecology in apes and other primates. Ecological, physical and behavioral aspects* (G. Hohmann, M. M. Robbins, & C. Boesch, eds), pp. 395–418. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. & Simons, A. 2009. *Nauclea orientalis* L. World Agroforestry Centre, Kenya.
- Owoyele, B.V. & Owolabi, G.O. 2014. Traditional oil palm (*Elaeis guineensis* jacq.) and its medicinal uses: A review. *Tang Humanit. Med.* **4**: 1–8.
- Parolin, P., Wittmann, F. & Ferreira, L. V. 2013. Fruit and seed dispersal in Amazonian floodplain trees - A review. *Ecotropica* **19**: 15–32.
- Pegard, A., Miquel, C., Valentini, A., Coissac, E., Bouvier, F., François, D., *et al.* 2009. Universal DNA-based methods for assessing the diet of grazing livestock and wildlife from feces. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 5700–5706.
- Peh, K.S.H., Sodhi, N.S., De Jong, J., Sekercioglu, C.H., Yap, C.A.M. & Lim, S.L.H. 2006. Conservation value of degraded habitats for forest birds in southern Peninsular Malaysia. *Divers. Distrib.* **12**: 572–581.
- Peres, C.A. 1999. General guidelines for standardizing line-transect surveys of tropical forest primates. *Neotrop. Primates* **7**: 11–16.
- Peres, C.A. 1991. Seed predation of *Cariniana micrantha* (Lecythidaceae) by brown capuchin monkeys in Central Amazonia. *Biotropica* **23**: 262–270.
- Peters, G. 2018. userfriendlyscience: Quantitative analysis made accessible. R package version 0.7.1.
- Petre, C.A., Tagg, N., Beudels-Jamar, R.C., Haurez, B. & Doucet, J.L. 2015. Western lowland gorilla seed dispersal: Are seeds adapted to long gut retention times? *Acta Oecologica* **67**: 59–65. Elsevier Masson SAS.
- Pettit, N.E. & Froend, R.H. 2001. Availability of seed for recruitment of riparian vegetation: A comparison of a tropical and a temperate river ecosystem in Australia. *Aust. J. Bot.* **49**: 515–528.
- Phillipps, Q. & Phillipps, K. 2016. *Phillipps' field guide to the mammals of Borneo and their ecology. Sabah, Sarawak, Brunei and Kalimantan*, Natural Hi. Kota Kinabalu.
- Phipps, C.D. 2014. Investigating the effects of riparian timber extraction on trophic interactions of three Cyprynid species from the the Kalabakan Basin, Northern Borneo using DNA metabarcoding. *MSc Thesis, Imp. Coll. London*.
- Pimm, S.L., Jenkins, C.N., Abell, R., Brooks, T.M., Gittleman, J.L., Joppa, L.N., *et al.* 2014. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science (80-.)*. **344**.
- Pimm, S.L., Russell, G.J., Gittleman, J.L. & Brooks, T.M. 1995. The Future of Biodiversity. *Science (80-.)*. **269**: 347–350.
- Piper, A.M., Batovska, J., Cogan, N.O.I., Weiss, J., Cunningham, J.P., Rodoni, B.C., *et al.* 2019. Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *Gigascience* **8**: 1–22. Oxford University Press.
- Poinar, H.N., Hofreiter, M., Spaulding, W.G., Martin, P.S., Stankiewicz, B.A., Bland, H., *et al.* 1998. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science (80-.)*. **281**: 402–406.
- Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O.C., Brown, D.S., Jarman, S.N. & Taberlet, P. 2012. Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. *Mol. Ecol.* **21**: 1931–1950.
- Primack, R.B. 1993. *Essentials of Conservation Biology*, Sinauer As. Sunderland.
- Proctor, S., McClean, C.J. & Hill, J.K. 2011. Protected areas of Borneo fail to protect forest landscapes with high habitat connectivity. *Biodivers. Conserv.* **20**: 2693–2704.

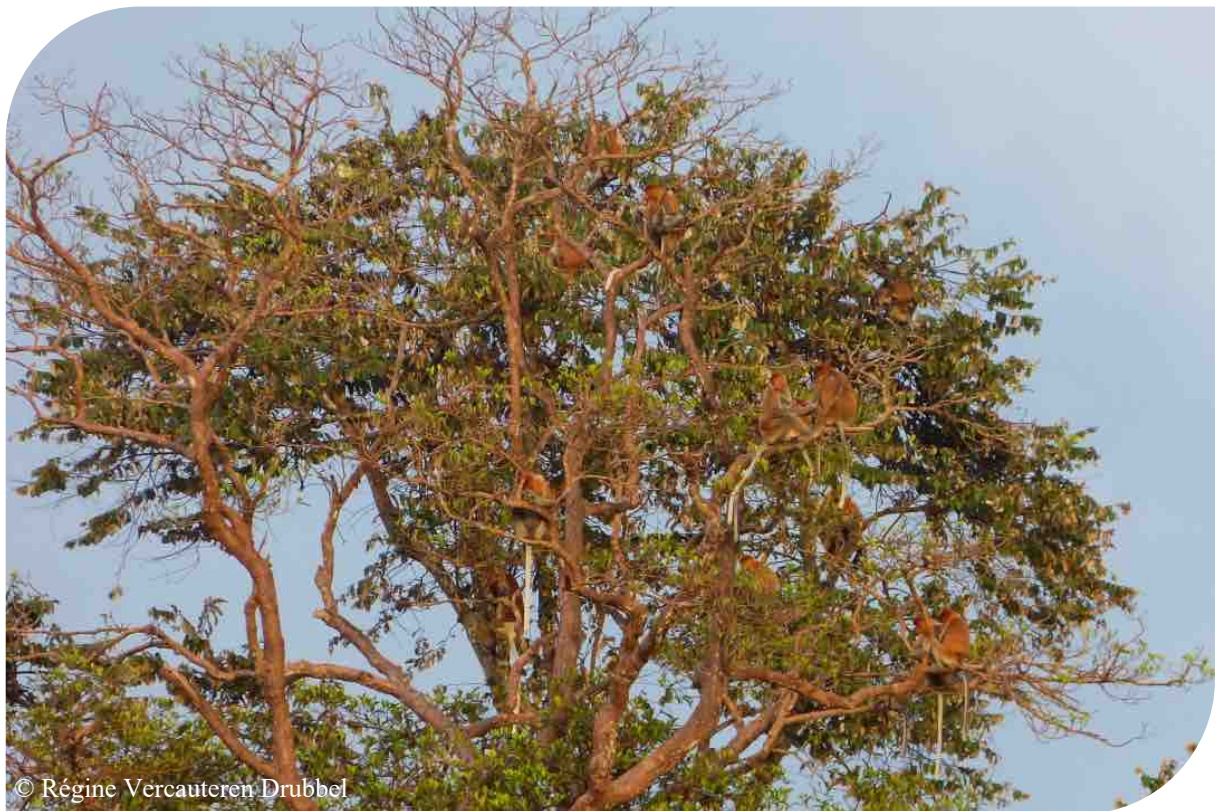
- Quéméré, E., Hibert, F., Miquel, C., Lhuillier, E., Rasolondraibe, E., Champeau, J., *et al.* 2013. A DNA metabarcoding study of a primate dietary diversity and plasticity across its entire fragmented range. *PLoS One* **8**.
- R Development Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. R 3.4.3. Vienna, Austria.
- Raffa, R.B. 2014. *Kratom and other mitragynines: the chemistry and pharmacology of opioids from a non-opium source*. (R. B. Raffa, ed). CRC Press.
- Ranglack, G. & Yeager, C. 1986. Survey of intestinal parasites found in proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) and long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Primate Rep.* **14**: 249.
- Rautner, M., Hardiono, M. & Alfred, R.J. 2005. *Borneo : Treasure island at risk. Status of forest, wildlife and related threats on the island of Borneo*. Frankfurt.
- Rayé, G., Miquel, C., Coissac, E., Redjadj, C., Loison, A. & Taberlet, P. 2011. New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: Chamois diet in autumn as a case study. *Ecol. Res.* **26**: 265–276.
- Razafindratsima, O.H., Jones, T. a. & Dunham, A.E. 2014. Patterns of movement and seed dispersal by three lemur species. *Am. J. Primatol.* **76**: 84–96.
- Razafindratsima, O.H., Sato, H., Tsuji, Y. & Culot, L. 2018. Advances and frontiers in primate seed dispersal. *Int. J. Primatol.* **39**: 315–320. International Journal of Primatology.
- Régnier, C., Achaz, G., Lambert, A., Cowie, R.H., Bouchet, P. & Fontaine, B. 2015. Mass extinction in poorly known taxa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**: 7761–7766.
- Remis, M.J., Dierenfeld, E.S., Mowry, C.B. & Carroll, R.W. 2001. Nutritional aspects of Western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) diet during seasons of fruit scarcity at Bai Hokou, Central African Republic. *Int. J. Primatol.* **22**: 807–836.
- Renecker, L.A. & Hudson, R.J. 1990. Digestive kinetics of moose (*Alces alces*), Wapiti (*Cervus elaphus*) and Cattle. *Anim. Prod.* **50**: 51–61.
- Reuters AP. 2019. Indonesia picks Jakarta capital replacement in East Kalimantan province on Borneo.
- Ricklefs, R.E. 2008. Disintegration of the ecological community. *Am. Nat.* **172**: 741–750.
- Rifai, N., Syaukat, Y., Siregar, H. & Gumbira-Sa-id, E. 2015. Factors affecting increased export of Indonesian palm oil and its derivative products to the United States of America market. *J. ISSAAS* **21**: 137–146.
- Rode, K.D., Chapman, C.A., Chapman, L.J. & McDowell, L.R. 2003. Mineral resource availability and consumption by Colobus in Kibale National Park, Uganda. *Int. J. Primatol.* **24**: 541–573.
- Rodríguez-Rodríguez, M.C., Jordano, P. & Valido, A. 2017. Functional consequences of plant-animal interactions along the mutualism-antagonism gradient. *Ecology* **98**: 1266–1276.
- Ross, J., Hearn, a. J., Johnson, P.J. & Macdonald, D.W. 2013. Activity patterns and temporal avoidance by prey in response to Sunda clouded leopard predation risk. *J. Zool.* **290**: 96–106.
- Rothman, J.M., Chapman, C.A. & van Soest, P.J. 2012. Methods in primate nutritional ecology: A user's guide. *Int. J. Primatol.* **33**: 542–566.
- Rovero, F., Zimmermann, F., Berzi, D. & Paul, M. 2013. “Which camera trap type and how many do I need ?” A review of camera features and study designs for a range of wildlife research applications. *Hystrix, Ital. J. Mammal.* **24**: 148–156.
- Ruppert, K.M., Kline, R.J. & Rahman, M.S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob. Ecol. Conserv.* **17**: 1–29.
- Sabah Wildlife Department. 2019a. *Bornean Banteng action plan for Sabah 2019-2028*. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.
- Sabah Wildlife Department. 2019b. *Proboscis monkey action plan 2019-2028*. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.
- Salter, R.E., MacKenzie, N.A., Nightingale, N., Aken, K.M. & Chai, P. 1985. Habitat use, ranging behaviour, and food habits of the proboscis monkey, *Nasalis larvatus* (van Wurmb), in Sarawak. *Primates* **26**: 436–451.
- Samuels, I.A. & Levey, D.J. 2005. Effects of gut passage on seed germination: Do experiments answer the questions they ask? *Funct. Ecol.* **19**: 365–368.
- Schipper, J. 2007. Camera-trap avoidance by kinkajous *Potos flavus*: rethinking the “non-invasive” paradigm. *Small Carniv. Conserv.* **36**: 38–41.
- Schipper, J., Chanson, J.S., Chiozza, F., Cox, N.A., Hoffmann, M., Katariya, V., *et al.* 2008. The status of the world's land and marine mammals: diversity, threat, and knowledge. *Science (80-.)*. **322**: 225–230.
- Schmidt, J.H. & Weidema, B.P. 2008. Shift in the marginal supply of vegetable oil. *Int. J. LCA* **13**: 235–239.
- Schultz, A.H. 1942. Growth and development of the proboscis monkey. *Bull. Museum Comp. Zool.* **89**.
- Schupp, E.W. 1993. Quantity, quality and the effectiveness of seed dispersal by animals. *Vegetatio* **107/108**: 15–29.
- Schwitzer, C., Glatt, L., Nekaris, K.A. & Ganzhorn, J.U. 2011. Responses of animals to habitat alteration : an overview focussing on primates. *Endanger. Species Res.* **14**: 31–38.

- Scott, J.M. 2008. SLIDES: Threats to Biological Diversity: Global, Continental, Local.
- Scriven, S.A., Beale, C.M., Benedick, S. & Hill, J.K. 2017. Barriers to dispersal of rain forest butterflies in tropical agricultural landscapes. *Biotropica* **49**: 206–216.
- Scriven, S.A., Hodgson, J.A., Mcclean, C.J. & Hill, J.K. 2015. Protected areas in Borneo may fail to conserve tropical forest biodiversity under climate change. *Biol. Conserv.* **184**: 414–423.
- Serio-Silva, J. & Rico-Gray, V. 2003. Howler monkeys (*Alouatta palliata mexicana*) as seed dispersers of strangler figs in disturbed and preserved habitat in southern Veracruz, Mexico. *Primates Fragm. Ecol. Conserv.* **351**: 267–281.
- Sha, J.C.M., Bernard, H. & Nathan, S. 2008. Status and conservation of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, East Malaysia. *Primate Conserv.* **23**: 107–120.
- Sha, J.C.M., Matsuda, I. & Bernard, H. 2011. *The Natural History of the Proboscis monkey*, Natural Hi (1st ed, ed). Kota Kinabalu.
- Shepherd, V.E. & Chapman, C.A. 1998. Dung beetles as secondary seed dispersers: Impact on seed predation and germination. *J. Trop. Ecol.* **14**: 199–215.
- Shvidenko, A., Barber, C.V., Persson, R., Gonzalez, P., Hassan, R., Lakyda, P., et al. 2005. Forest and woodland systems. In: *Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends* (R. Hassan, R. Scholes, & N. Ash, eds), pp. 585–621. Island Press, Washington DC.
- Silveira, L., Jácomo, A.T.A. & Diniz-Filho, F.D.-F. 2003. Camera trap, line transect census and track surveys: a comparative evaluation. *Biol. Conserv.* **114**: 351–355.
- Silver, S.C., Ostro, L.E.T., Yeager, C.P. & Dierenfeld, E.S. 2000. Phytochemical and mineral components of foods consumed by black howler monkeys (*Alouatta pigra*) at two sites in Belize. *Zoo Biol.* **19**: 95–109.
- Singmann, H., Bolker, B., Westfall, J. & Aust, F. 2017. afex: analysis of factorial experiments.
- Sodhi, N.S., Koh, L.P., Brook, B.W. & Ng, P.K.L. 2004. Southeast Asian biodiversity: An impending disaster. *Trends Ecol. Evol.* **19**: 654–660.
- Soendjoto, M.A. 2005. Lowland-Edge Vegetation on Habitat of Proboscis Monkey (*Nasalis larvatus*) in Rubber Forest of Tabalong District, South Kalimantan. *Biodiversitas, J. Biol. Divers.* **6**: 40–44.
- Soininen, E.M., Valentini, A., Coissac, E., Miquel, C., Gielly, L., Brochmann, C., et al. 2009. Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures. *Front. Zool.* **9**: 1–9.
- Soxhlet, F. 1979. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Polytech. J.* **232**.
- Srivathsan, A., Ang, A., Vogler, A.P. & Meier, R. 2016. Fecal metagenomics for the simultaneous assessment of diet, parasites, and population genetics of an understudied primate. *Front. Zool.* 1–13. *Frontiers in Zoology*.
- Srivathsan, A., Sha, J.C.M., Vogler, A.P. & Meier, R. 2014. Comparing the effectiveness of metagenomics and metabarcoding for diet analysis of a leaf-feeding monkey (*Pygathrix nemaeus*). *Mol. Ecol. Resour.* **15**: 250–261.
- Stark, D., Nijman, V., Lhota, S., Robins, J. & Goossens, B. 2012. Modeling population viability of local proboscis monkey *Nasalis larvatus* populations: conservation implications. *Endanger. Species Res.* **16**: 31–43.
- Stark, D.J. 2018. Habitat use and movement of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in a degraded and human-modified forest landscape. PhD Thesis, Cardiff University.
- Stark, D.J., Vaughan, I.P., Evans, L.J., Kler, H. & Goossens, B. 2017a. Combining drones and satellite tracking as an effective tool for informing policy change in riparian habitats: A proboscis monkey case study. *Remote Sens. Ecol. Conserv.* 1–9.
- Stark, D.J., Vaughan, I.P., Saldivar, D.A.R., Nathan, S.K.S.S. & Goossens, B. 2017b. Evaluating methods for estimating home ranges using GPS collars: A comparison using proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*). *PLoS One* **12**: 1–23.
- State of Sabah. 1998. *Sabah Water Resources Enactment*.
- Stocker, A.G.C. & Irvine, A.K. 1983. Seed dispersal by cassowaries (*Casuaris casuaris*) in North Queensland's rainforests. *Biotropica* **15**: 170–176.
- Sussman, R.W. & Tattersall, I. 1981. Behavior and ecology of *Macaca fascicularis* in Mauritius: A preliminary study. *Primates* **22**: 192–205.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C. & Willerslev, E. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* **21**: 2045–2050.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., et al. 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* **35**.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **17**: 1105–1109.
- Takemoto, H. 2003. Phytochemical determination for leaf food choice by wild chimpanzees in Guinea, Bossou. *J. Chem. Ecol.* **29**: 2551–2573.
- Teaford, M.F., Lucas, P.W., Ungar, P.S. & Glander, K.E. 2006. Mechanical defenses in leaves eaten by Costa Rican howling monkeys (*Alouatta palliata*). *Am. J. Phys. Anthropol.* **129**: 99–104.

- Terborgh, J., Pitman, N., Silman, M., Schichter, H. & Núñez V, P. 2002. Maintenance of tree diversity in tropical forests. In: *Seed dispersal and frugivory: Ecology, evolution and conservation* (D. J. Levey, W. R. Silva, & M. Galetti, eds), pp. 1–17. CAB International.
- Tewksbury, J.J., Levey, D.J., Haddad, N.M., Sargent, S., Orrock, J.L., Weldon, A., *et al.* 2002. Corridors affect plants, animals, and their interactions in fragmented landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 12923–12926.
- Therneau, T.M. 2015. A Package for Survival Analysis in S.
- Thiry, V., Bhasin, O., Stark, D.J., Beudels-Jamar, R.C., Vercauteren Drubbel, R., Nathan, S.K.S.S., *et al.* 2019. Seed dispersal by proboscis monkeys: the case of *Nauclea* spp. *Primates* **60**: 449–457. Springer Japan.
- Thiry, V., Stark, D.J., Goossens, B., Slachmuylder, J.-L., Vercauteren Drubbel, R. & Vercauteren, M. 2016. Use and selection of sleeping sites by proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*, along the Kinabatangan River, Sabah, Malaysia. *Folia Primatol.* **87**: 180–196.
- Traveset, A., Bermejo, T. & Willson, M. 2001. Effect of manure composition on seedling emergence and growth of two common shrub species of Southeast Alaska. *Plant Ecol.* **155**: 29–34.
- Traveset, Robertson, A.W. & Rodríguez-Pérez, J. 2007. A review on the role of endozoochory in seed germination. In: *Seed dispersal: Theory and its application in a changing world* (A. J. Dennis, E. W. Schupp, R. J. Green, & D. A. Westcott, eds), pp. 78–103. CAB International.
- Traveset & Verdu, M. 2002. A meta-analysis of the effect of gut treatment on seed germination. In: *Seed dispersal and frugivory: Ecology, evolution and conservation* (D. J. Levey, W. R. Silva, & M. Galetti, eds), pp. 339–350. CAB International.
- Trolliet, F., Serckx, A., Forget, P., Beudels-jamar, R.C., Huynen, M. & Hambuckers, A. 2016. Ecosystem services provided by a large endangered primate in a forest-savanna mosaic landscape. *Biol. Conserv.* **203**: 55–66.
- Tsuji, Y., Ningsih, J.I.D.P., Kitamura, S., Widayati, K.A. & Suryobroto, B. 2017. Neglected seed dispersers: endozoochory by Javan lutungs (*Trachypitecus auratus*) in Indonesia. *Biotropica* **49**: 539–545.
- Turner, E.C. & Foster, W.A. 2009. The impact of forest conversion to oil palm on arthropod abundance and biomass in Sabah, Malaysia. *J. Trop. Ecol.* **25**: 23–30.
- Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M.A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., *et al.* 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: The trnL approach. *Mol. Ecol. Resour.* **9**: 51–60.
- Venkataraman, V. V., Glowacka, H., Fritz, J., Clauss, M., Seyoum, C., Nguyen, N., *et al.* 2014. Effects of dietary fracture toughness and dental wear on chewing efficiency in geladas (*Theropithecus gelada*). *Am. J. Phys. Anthropol.* **155**: 17–32.
- Vié, J., Hilton-taylor, C. & Stuart, S.N. 2009. *La vie sauvage dans un monde en mutation – La Liste rouge de l’UICN des espèces menacées: Analyse de la liste 2008*. IUCN, Gland Suisse.
- Vijay, V., Pimm, S.L., Jenkins, C.N. & Smith, S.J. 2016. The impacts of oil palm on recent deforestation and biodiversity loss. *PLoS One* **11**: e0159668.
- Vitousek, P.M., Mooney, H. a, Lubchenco, J. & Melillo, J.M. 1997. Human domination of Earth’s ecosystems. *Science* (80-.). **277**: 494–499.
- Vogel, E.R., van Woerden, J.T., Lucas, P.W., Utami Atmoko, S.S., van Schaik, C.P. & Dominy, N.J. 2008. Functional ecology and evolution of hominoid molar enamel thickness: Pan troglodytes schweinfurthii and Pongo pygmaeus wurmbii. *J. Hum. Evol.* **55**: 60–74.
- Wang, B.C. & Smith, T.B. 2002. Closing the seed dispersal loop. *Trends Ecol. Evol.* **17**: 379–385.
- Waterman, P.G. & Kool, K.M. 1994. Colobine food selection and plant chemistry. In: *Colobine Monkeys: Their Ecology, Behaviour, and Evolution* (A. G. Davies & J. F. Oates, eds), pp. 251–284. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Watts, D.P. 1987. Effects of mountain gorilla foraging activities on the productivity of their food plant species. *Afr. J. Ecol.* **25**: 155–163.
- Weary, T.E., Wrangham, R.W. & Clauss, M. 2017. Applying wet sieving fecal particle size measurement to frugivores: A case study of the eastern chimpanzee (Pan troglodytes schweinfurthii). *Am. J. Phys. Anthropol.* **163**: 510–518.
- Whitten, T., van Dijk, P.P., Curran, L., Meijaard, E., Supriatna, J. & Ellis, S. 2004. Sundaland. In: *Hotspots revisited* (R. A. Mittermeier, P. R. Gil, M. Hoffmann, J. Pilgrim, T. Brooks, C. G. Mittermeier, *et al.*, eds), pp. 164–174. CEMEX, Mexico city.
- Wich, S., Struebig, M., Refisch, J., Wilting, A., Kramer-Schadt, S. & Meijaard, E. 2015. *The future of the Bornean orangutan: Impacts of change in land cover and climate*.
- Willson, M.F. & Traveset, A. 2000. The ecology of seed dispersal. In: *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities* (M. Fenner, ed), pp. 85–110. CAB International.
- Wilson, E. 1988. The current state of biological diversity. In: *Biodiversity* (E. O. Wilson & F. M. Peter, eds), pp. 3–18.
- WLT. 2016. Million pound appeal for Borneo: Keruak corridor is closed to completion.

- Woods, A. 1995. Observations on dietary habits of proboscis monkeys, *Nasalis larvatus*, at Danau Sentarum Wildlife Reserve, Kalimantan Barat, Republic of Indonesia.
- WWF. 2018. *Living planet report - 2018: Aiming higher* (M. Grooten & R. E. A. Almond, eds). Gland, Switzerland.
- WWF. 2016. *Living planet report 2016: Risk and resilience in a new era*.
- WWF. 2017. *The environmental status of Borneo 2016 report*. Jakarta.
- Yeager, C.P. 1989. Feeding ecology of the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Int. J. Primatol.* **10**: 497–530.
- Yeager, C.P. 1991. Proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) social organization: Intergroup patterns of association. *Am. J. Primatol.* **23**: 73–86.
- Yeager, C.P., Silver, S.C. & Dierenfeld, E.S. 1997. Mineral and phytochemical influences on foliage selection by the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *Am. J. Primatol.* **41**: 117–128.
- Yoccoz, N.G. 2012. The future of environmental DNA in ecology. *Mol. Ecol.* **21**: 2031–2038.
- Zhao, H., Wang, X., Kreigenhofer, B., Qi, X., Guo, S., Wang, C., *et al.* 2013. Study on the nutritional ecology of wild primates. *Acta Ecol. Sin.* **33**: 185–191. Ecological Society of China.

10 Annexes



© Régine Vercauteren Drubbel

10.1 Figures et tableaux

Annexe 1. Liste des familles et espèces de plantes présentes dans les 25 plots botaniques

Familles et espèces	Nombre d'individus		
Achariaceae	10	<i>Parinari oblongifolia</i>	1
<i>Hydnocarpus polypetalus</i>	2	<i>Maranthes corymbosa</i>	1
<i>Hydnocarpus anomalus</i>	2	Clusiaceae	54
<i>Hydnocarpus sp.</i>	2	<i>Garcinia parvifolia</i>	52
<i>Hydnocarpus borneensis</i>	2	<i>Garcinia forbesii</i>	2
<i>Hydnocarpus gracilis</i>	2	Combretaceae	2
Anacardiaceae	40	<i>Combretum sp.1</i>	2
<i>Dracontomelon dao</i>	39	Connaraceae	6
<i>Drimycarpus luridus</i>	1	<i>Agelaea trinervis</i>	4
Annonaceae	50	<i>Connarus grandis</i>	1
<i>Polyalthia obliqua</i>	15	<i>Agelaea sp.</i>	1
<i>Cananga odorata</i>	12	Convolvulaceae	6
<i>Uvaria littoralis</i>	12	<i>Erycibe grandifolia</i>	6
<i>Artabotrys suaveolens</i>	8	Dilleniaceae	504
Unknown	1	<i>Dillenia excelsa</i>	492
<i>Desmos sp.1</i>	1	<i>Dillenia borneensis</i>	9
<i>Mezzettia sp.1</i>	1	<i>Tetracera macrophylla</i>	3
Apocynaceae	14	Dipterocarpaceae	73
<i>Rauvolfia sumatrana</i>	10	<i>Vatica rassak</i>	48
<i>Alstonia sp.</i>	2	<i>Dipterocarpus validus</i>	14
<i>Willughbeia beccariana</i>	1	<i>Vatica venulosa</i>	11
<i>Kibatalia arborea</i>	1	Ebenaceae	117
Aquifoliaceae	2	<i>Diospyros sp.</i>	35
<i>Ilex cymosa</i>	2	<i>Diospyros curranii</i>	30
Araliaceae	1	<i>Diospyros tuberculata</i>	18
<i>Schefflera avenis</i>	1	<i>Diospyros elliptifolia</i>	14
Calophyllaceae	8	<i>Diospyros wallichii</i>	7
<i>Mesua oblongifolia</i>	3	<i>Diospyros racemosa</i>	4
<i>Calophyllum blancoi</i>	3	<i>Diospyros sp.2</i>	3
<i>Mesua sp.</i>	1	<i>Diospyros sp.5</i>	2
<i>Calophyllum sp.</i>	1	<i>Diospyros toposia</i>	2
Capparaceae	10	<i>Diospyros sp.4</i>	1
<i>Crateva religiosa</i>	8	<i>Diospyros sp.1</i>	1
<i>Crateva sp.</i>	2	Elaeocarpaceae	5
Celastraceae	7	<i>Elaeocarpus clementis</i>	2
<i>Lophopetalum multinervium</i>	5	<i>Elaeocarpus stipularis</i>	2
<i>Salacia sp.1</i>	1	<i>Elaeocarpus sp.</i>	1
<i>Salacia sp.</i>	1	Erythroxylaceae	1
Chrysobalanaceae	2	<i>Erythroxylum cuneatum</i>	1
		Escalloniaceae	1
		<i>Polyosma sp.1</i>	1

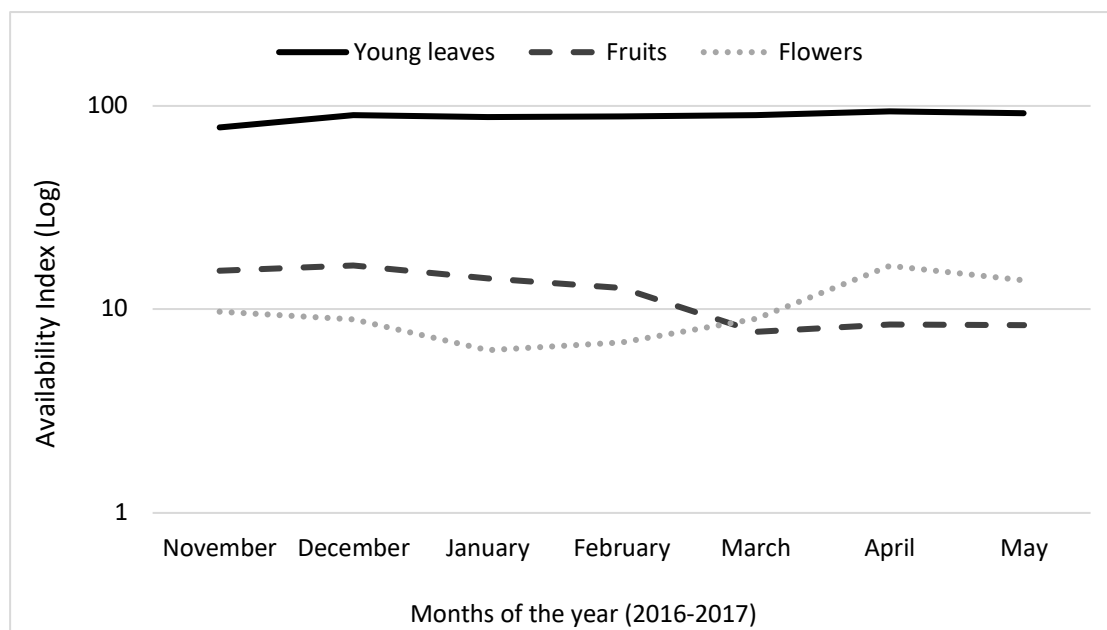
Euphorbiaceae	498	<i>Caesalpinia</i> sp.1	3
<i>Mallotus muticus</i>	360	<i>Caesalpinia</i> sp.	2
<i>Shirakiopsis indica</i>	50	<i>Dialium indum</i>	2
<i>Croton triqueter</i>	38	<i>Derris</i> sp.1	1
<i>Croton oblongus</i>	31	<i>Spatholobus macropterus</i>	1
<i>Mallotus floribundus</i>	13	<i>Dalbergia parviflora</i>	1
<i>Hancea penangensis</i>	3	<i>Koompassia excelsa</i>	1
<i>Croton caudatus</i>	2	<i>Spatholobus viridis</i>	1
<i>Mallotus mollissimus</i>	1	<i>Ormosia calavensis</i>	1
Gnetaceae	3	<i>Derris elegans</i>	1
<i>Gnetum cuspidatum</i>	2	Loganiaceae	1
<i>Gnetum gnemonoides</i>	1	<i>Norrisia</i> sp.1	1
Hypericaceae	9	Lophopyxidaceae	458
<i>Cratoxylum cochinchinense</i>	6	<i>Lophopyxis maingayi</i>	458
<i>Cratoxylum sumatranum</i>	2	Lythraceae	26
<i>Cratoxylum</i> sp.	1	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	26
Lamiaceae	154	Malvaceae	511
<i>Vitex pinnata</i>	154	<i>Colona serratifolia</i>	233
Lauraceae	81	<i>Pterospermum elongatum</i>	128
<i>Beilschmiedia</i> sp.	14	<i>Pterospermum diversifolium</i>	73
<i>Beilschmiedia lucidula</i>	14	<i>Microcos crassifolia</i>	50
<i>Litsea accedens</i>	13	<i>Kleinhovia hospita</i>	17
<i>Beilschmiedia micrantha</i>	8	<i>Diplodiscus parviflorus</i>	8
<i>Litsea lancifolia</i>	7	<i>Pterospermum</i> sp.	2
<i>Actinodaphne glomerata</i>	6	Melastomataceae	79
<i>Cinnamomum</i> sp.	6	<i>Pternandra</i> sp.1	25
<i>Litsea</i> sp.	3	<i>Memecylon paniculatum</i>	25
<i>Cinnamomum</i> sp.1	2	<i>Pternandra</i> sp.2	11
<i>Dehaasia caesia</i>	2	<i>Memecylon</i> sp.	11
<i>Dehaasia firma</i>	1	<i>Memecylon borneense</i>	7
<i>Litsea unita</i>	1	Meliaceae	2
<i>Dehaasia</i> sp.	1	<i>Dysoxylum parasiticum</i>	1
<i>Cryptocarya ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	1	<i>Dysoxylum cyrtobotryum</i>	1
<i>Lindera lucida</i>	1	Moraceae	39
<i>Litsea fulva</i>	1	<i>Ficus</i> sp.	12
Lecythidaceae	11	<i>Ficus fistulosa</i>	9
<i>Planchonia valida</i>	9	<i>Artocarpus</i> sp.	8
<i>Barringtonia pterita</i>	2	<i>Ficus crassiramea</i>	4
Leguminosae	255	<i>Artocarpus teysmannii</i>	2
<i>Entada rheedii</i>	113	<i>Ficus</i> sp.1	1
<i>Dalbergia stipulacea</i>	85	<i>Prainea limpato</i>	1
<i>Crudia reticulata</i>	17	<i>Ficus benjamina</i>	1
<i>Pongamia pinnata</i>	11	<i>Ficus septica</i>	1
<i>Bauhinia yunnanensis</i>	5	Myristicaceae	14
<i>Senna tora</i>	4	<i>Knema</i> sp.	10
<i>Cynometra</i> sp.	3	<i>Knema laurina</i>	3
<i>Dalbergia rostrata</i>	3	<i>Knema latericia</i>	1
		Myrtaceae	218
		<i>Syzygium fastigiatum</i>	96

<i>Syzygium</i> sp.	90	<i>Gardenia elata</i>	8
<i>Syzygium</i> sp.1	23	<i>Uncaria</i> sp.1	7
<i>Syzygium acuminatissimum</i>	4	<i>Neolamarckia cadamba</i>	6
<i>Syzygium kunstleri</i>	3	<i>Ceriscoides perakensis</i>	2
<i>Syzygium formosum</i>	2	<i>Antirhea inaequalis</i>	1
Phyllanthaceae	471	<i>Canthium</i> sp.1	1
<i>Antidesma puncticulatum</i>	186	Rutaceae	1
<i>Baccaurea tetrandra</i>	111	<i>Melicope lunu-ankenda</i>	1
<i>Bridelia stipularis</i>	92	Salicaceae	57
<i>Cleistanthus</i> sp.	30	<i>Homalium caryophyllaceum</i>	49
<i>Cleistanthus oblongifolius</i>	30	<i>Xylosma sumatrana</i>	7
<i>Glochidion cf rubrum</i>	6	<i>Flacourtia rukam</i>	1
<i>Glochidion</i> sp.	5	Sapindaceae	41
<i>Aporosa nigricans</i>	4	<i>Mischocarpus pentapetalus</i>	40
<i>Bridelia insulana</i>	3	<i>Allophylus cobbe</i>	1
<i>Margaritaria indica</i>	2	Sapotaceae	11
<i>Baccaurea bracteata</i>	1	<i>Madhuca dubardii</i>	6
<i>Aporosa grandistipula</i>	1	<i>Palaquium</i> sp.	4
Polygalaceae	7	<i>Palaquium dasyphyllum</i>	1
<i>Xanthophyllum neglectum</i>	3	Simaroubaceae	3
<i>Xanthophyllum</i> sp.	2	<i>Quassia indica</i>	3
<i>Xanthophyllum ellipticum</i>	1	Tetramelaceae	6
<i>Xanthophyllum florescens</i>	1	<i>Octomeles sumatrana</i>	6
Primulaceae	1	Unknown	331
<i>Ardisia purpurea</i>	1	Unknown	270
Putranjivaceae	21	Unknown sp.3	29
<i>Drypetes castilloi</i>	21	Unknown sp.1	14
Rhamnaceae	6	Unknown sp.2	7
<i>Ventilago dichotoma</i>	4	Unknown sp.7	4
<i>Ziziphus borneensis</i>	2	Unknown sp.6	3
Rhizophoraceae	11	Unknown sp.8	2
<i>Carallia brachiata</i>	11	Unknown sp.5	1
Rubiaceae	211	Unknown sp.4	1
<i>Nauclea subdita</i>	63	Urticaceae	1
<i>Mitragyna speciosa</i>	42	<i>Poikilospermum suaveolens</i>	1
<i>Nauclea orientalis</i>	34	Vitaceae	6
<i>Urophyllum sandahanicum</i>	18	<i>Tetrastigma lanceolarium</i>	5
<i>Ludekia borneensis</i>	16	<i>Leea indica</i>	1
<i>Uncaria</i> sp.	13	Total général	4457

Annexe 2. Liste des familles et espèces de plantes présentes dans les 25 plots de phénologie

Familles et espèces	Nombre d'individus		
Achariaceae	3	Lamiaceae	14
<i>Hydnocarpus anomalus</i>	1	<i>Vitex pinnata</i>	13
<i>Hydnocarpus woodii</i>	2	<i>Vitex vestita</i>	1
Anacardiaceae	17	Lauraceae	11
<i>Dracontomelon costatum</i>	1	<i>Actinodaphne glomerata</i>	1
<i>Dracontomelon dao</i>	13	<i>Alseodaphne bancana</i>	1
<i>Mangifera</i> sp.	2	<i>Beilschmiedia micrantha</i>	2
<i>Melanochyla cf. castaneifolia</i>	1	<i>Beilschmiedia</i> sp.	2
Annonaceae	5	<i>Cryptocarya ferrea</i>	2
<i>Cananga odorata</i>	1	<i>Litsea accedens</i> var. <i>accedens</i>	1
<i>Polyalthia obliqua</i>	3	<i>Litsea</i> sp.	2
<i>Polyalthia</i> sp.	1	Lecythidaceae	3
Apocynaceae	4	<i>Planchonia valida</i>	3
<i>Alstonia angostiloba</i>	3	Leguminosae	6
<i>Rauvolfia sumatrana</i>	1	<i>Cynometra elmeri</i>	5
Burseraceae	2	<i>Dialium indum</i>	1
<i>Canarium odontophyllum</i>	1	Lythraceae	6
<i>Canarium</i> sp.	1	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	6
Calophyllaceae	1	Malvaceae	159
<i>Mesua macrantha</i>	1	<i>Colona serratifolia</i>	57
Capparaceae	5	<i>Kleinhovia hospita</i>	66
<i>Crateva religiosa</i>	5	<i>Microcos crassifolia</i>	4
Clusiaceae	6	<i>Pterospermum diversifolium</i>	12
<i>Garcinia parvifolia</i>	6	<i>Pterospermum elongatum</i>	19
Connaraceae	1	<i>Pterospermum</i> sp.	1
<i>Agelaea borneensis</i>	1	Melastomataceae	9
Cornaceae	1	<i>Memecylon laevigatum</i>	4
<i>Alangium javanicum</i>	1	<i>Memecylon paniculatum</i>	1
Dilleniaceae	89	<i>Memecylon</i> sp.	3
<i>Dillenia borneensis</i>	6	<i>Pternandra coerulescens</i>	1
<i>Dillenia excelsa</i>	83	Meliaceae	3
Dipterocarpaceae	13	<i>Aglaia sessifolia</i>	1
<i>Dipterocarpus validus</i>	5	<i>Aglaia</i> sp.	1
<i>Hopea nervosa</i>	4	<i>Walsura pinnata</i>	1
<i>Vatica rassak</i>	4	Moraceae	11
Ebenaceae	9	<i>Artocarpus kemando</i>	1
<i>Diospyros elliptifolia</i>	1	<i>Ficus callosa</i>	1
<i>Diospyros</i> sp.	5	<i>Ficus fistulosa</i>	3
<i>Diospyros wallichii</i>	3	<i>Ficus globosa</i>	1
Euphorbiaceae	84	<i>Ficus racemosa</i>	5
<i>Cleistanthus megacarpus</i>	5	Myristicaceae	1
<i>Croton oblongus</i>	5	<i>Knema laurina</i>	1
<i>Hancea penangensis</i>	1	Myrtaceae	11
<i>Macaranga gigantifolia</i>	1	<i>Eugenia</i> sp.	3
<i>Macaranga tanarius</i>	1	<i>Syzygium fastigiatum</i>	7
<i>Mallotus floribundus</i>	4	<i>Syzygium leptostemon</i>	1
<i>Mallotus mollissimus</i>	5	Phyllanthaceae	38
<i>Mallotus muticus</i>	62	<i>Antidesma puncticulatum</i>	31
		<i>Baccaurea tetrandra</i>	4
		<i>Glochidion borneensis</i>	3

Polygalaceae	10	<i>Allophylus cobbe</i>	1
<i>Xanthophyllum ellipticum</i>	10	<i>Dimocarpus longan</i>	1
Putranjivaceae	1	<i>Dimocarpus</i> sp.	1
<i>Drypetes castilloi</i>	1	<i>Mischocarpus pentapetalus</i>	4
Rubiaceae	29	<i>Nephelium</i> sp.	1
<i>Mitragyna speciosa</i>	1	Sapotaceae	8
<i>Nauclea orientalis</i>	24	<i>Madhuca dubardii</i>	3
<i>Nauclea subdita</i>	2	<i>Palaquium rostratum</i>	1
<i>Urophyllum sandahanicum</i>	2	<i>Palaquium</i> sp.	4
Rutaceae	2	Tetramelaceae	3
<i>Melicope lunu-ankenda</i>	1	<i>Octomeles sumatrana</i>	3
<i>Murraya paniculata</i>	1	Vitaceae	1
Salicaceae	11	<i>Tetrastigma lanceolarium</i>	1
<i>Xylosma sumatrana</i>	11	Total général	585
Sapindaceae	8		



Annexe 3. Disponibilité en jeunes feuilles, fruits et fleurs au cours de l'étude



Annexe 4. *Nauclea orientalis* : a) aspect général de l'arbre, b) tronc, c) et d) feuilles



Annexe 5. *Nauclea orientalis* : a) fleurs, b) fruit, c) coupe transversal dans un fruit, et d) graines

10.2 Utilisation et sélection des sites dorts par les nasiques le long du fleuve Kinabatangan

Original Research Article

Folia Primatol 2016;87:180–196
DOI: 10.1159/000449219

Received: November 2, 2015
Accepted after revision: August 18, 2016
Published online: October 12, 2016

Use and Selection of Sleeping Sites by Proboscis Monkeys, *Nasalis larvatus*, along the Kinabatangan River, Sabah, Malaysia

Valentine Thiry^{a, b} Danica J. Stark^{c, e} Benoît Goossens^{c–f}
Jean-Louis Slachmuylder^a Régine Vercauteren Drubbel^a
Martine Vercauteren^a

^aAnthropology and Human Genetics Unit, Université libre de Bruxelles, and ^bConservation Biology Unit, Education and Nature, Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels, Belgium; ^cDanau Girang Field Centre, c/o Sabah Wildlife Department, and ^dSabah Wildlife Department, Wisma Muis, Kota Kinabalu, Malaysia; ^eCardiff School of Biosciences and ^fSustainable Places Research Institute, Cardiff University, Cardiff, UK

Key Words

Nasalis larvatus · Sleeping tree characteristics · Surrounding trees · Antipredation strategy · Boat survey · North Borneo

Abstract

The choice of a sleeping site is crucial for primates and may influence their survival. In this study, we investigated several tree characteristics influencing the sleeping site selection by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) along Kinabatangan River, in Sabah, Malaysia. We identified 81 sleeping trees used by one-male and all-male social groups from November 2011 to January 2012. We recorded 15 variables for each tree. Within sleeping sites, sleeping trees were taller, had a larger trunk, with larger and higher first branches than surrounding trees. The crown contained more mature leaves, ripe and unripe fruits but had vines less often than surrounding trees. In addition, in this study, we also focused on a larger scale, considering sleeping and non-sleeping sites. Multivariate analyses highlighted a combination of 6 variables that revealed the significance of sleeping trees as well as surrounding trees in the selection process. During our boat surveys, we observed that adult females and young individuals stayed higher in the canopy than adult males. This pattern may be driven by their increased vulnerability to predation. Finally, we suggest that the selection of particular sleeping tree features (i.e. tall, high first branch) by proboscis monkeys is mostly influenced by anti-predation strategies.

© 2016 S. Karger AG, Basel

KARGER

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/fpr

© 2016 S. Karger AG, Basel
0015–5713/16/0873–0180\$39.50/0

Valentine Thiry
Anthropology and Human Genetics Unit, Université
libre de Bruxelles, 50, avenue F.D.-Roosevelt, PO Box 192
BE–1050 Brussels (Belgium)
E-Mail vthiry@ulb.ac.be

BASEL
10:20:20 AM

Introduction

Sleeping site selection is crucial for non-human primates. They spend about half of their lives at sleeping sites [Anderson, 1998], and their choice may affect individual survival [Reichard, 1998; Lutermann et al., 2010; Teichroeb et al., 2012]. Sleeping tree selection may be influenced by several factors, such as predation threat, food proximity, parasite avoidance, avoidance of competitors, thermoregulation, risk of falling, need for comfort and social interactions [Hausfater and Meade, 1982; von Hippel, 1998; Di Bitetti et al., 2000; Li et al., 2006; Phoonjampa et al., 2010; Cheyne et al., 2012; Teichroeb et al., 2012]. These factors vary among primate species and are generally not mutually exclusive [Reichard, 1998; Teichroeb et al., 2012]. They depend on species ecology and may affect individual survival and reproductive success [Cheyne et al., 2012; Teichroeb et al., 2012]. Tree characteristics differ according to the sleeping site function (antipredation, food proximity, stability, etc.). Therefore, primates choose a sleeping site that balances their needs or presents the best trade-off to ensure their survival [Hankerson et al., 2007].

Predator avoidance is the main hypothesis found in the literature on sleeping tree selection by primates [Liu and Zhao, 2004; Teichroeb et al., 2012]. Primates are vulnerable when they sleep, and different strategies have been observed to prevent terrestrial predation at night. They can select sleeping trees in order to: (1) make access more difficult for terrestrial predators, i.e. tall emergent trees [Reichard, 1998; Di Bitetti et al., 2000; Cui et al., 2006], high first branches [Liu and Zhao, 2004; Li et al., 2006; Duarte and Young, 2011], crowns without lianas [Phoonjampa et al., 2010; Barnett et al., 2012; Fei et al., 2012] or location on steep slopes [Liu and Zhao, 2004; Fan and Jiang, 2008]; (2) increase concealment, such as with dense canopy cover [Anderson, 1984; Teichroeb et al., 2012]; (3) get a better view to monitor the ground, i.e. less canopy cover [Hankerson et al., 2007], close to rivers [Bernard et al., 2011; Barnett et al., 2012]; (4) provide good escape routes in case of predator approach by high arboreal connectivity with surrounding trees [Hankerson et al., 2007; Fan and Jiang, 2008; Bernard et al., 2011]; and (5) avoid predator presence (proximity to human settlements [Ramakrishnan and Coss, 2001]). Primates tend to select for the structure and location of the sleeping tree. They may also choose to use multiple sleeping sites and therefore rarely sleep at the same site over consecutive nights to prevent predators from predicting their location [Smith et al., 2007; Phoonjampa et al., 2010; Teichroeb et al., 2012].

Food proximity is another frequent hypothesis to explain sleeping tree selection. Primate groups often sleep in the vicinity of the last or next feeding site, which is recognized as a strategy to reduce their time and energy spent travelling [Chapman et al., 1989; von Hippel, 1998; Day and Elwood, 1999; Pontes et al., 2005; Albert et al., 2011]. Nevertheless, generally primates do not sleep directly in food trees because (1) fruits could be used by predators as an indication of the presence of prey, and (2) nocturnal frugivores might seek fruiting trees and disturb sleeping primates [Sugardjito, 1983].

Proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) are endemic to the island of Borneo. They are large, arboreal and sexually dimorphic colobine primates [Bennett and Sebastian, 1988]. As other Asian colobines, they form stable one-male social groups – consisting of a single adult male, several females and their offspring – and all-male groups – composed of males of different ages [Yeager, 1990; Murai, 2006]. Proboscis monkeys are

restricted to coastal mangrove, swamp and riverine forests [Meijaard and Nijman, 2000; Sha et al., 2008; Stark et al., 2012]. They generally forage inland and return to the riverbank in late afternoon to rest and spend the night along the river's edge [Matsuda et al., 2011]. The proximity to the river has been suggested to be an antipredation strategy allowing primates to reduce their attention at sleeping sites – predators, e.g. Sunda clouded leopards (*Neofelis diardi*), approaching only from the landward side. However, estuarine crocodiles (*Crocodylus porosus*) may also predate on proboscis monkeys when they cross the river [Matsuda et al., 2008b]. Therefore, proboscis monkeys seem to frequently choose sleeping locations where the tributary is narrower or the branch-to-bank distance is shorter, providing them better escape routes by swimming or jumping to the opposite side in case of a predator attack [Matsuda et al., 2008a].

In this paper, we analyse sleeping site selection by proboscis monkey groups along the Kinabatangan River and study how different age-sex classes use different tree heights. Previous studies did not examine the 'food proximity' hypothesis in the sleeping site selection of proboscis monkeys. Here, due to our study design (groups were observed only at sleeping sites and not followed the entire day), we could not test this hypothesis in detail. However, we decided to consider if leaf, fruit and flower – potential food – abundances in the trees at sleeping sites could be determining factors influencing proboscis monkey's choice. Further, we will refer to this as the 'potential food abundance' hypothesis. Moreover, previous studies have documented sleeping tree preferences in proboscis monkeys by focusing on the species and physical characteristics of sleeping trees and comparing them to other available trees in the study area [Matsuda et al., 2008a; Bernard et al., 2011; Feilen and Marshall, 2014]. However, a sleeping tree may not be selected based on only its own physical features, but also on those of the trees surrounding it [Hankerson et al., 2007]. Therefore, to test both the 'antipredation' and 'potential food abundance' hypotheses, we worked at two different scales: fine (sleeping tree) and large (sleeping site) scales. First, we compared sleeping trees to surrounding trees to highlight sleeping tree characteristics in comparison to other available trees located in direct proximity to sleeping trees. Second, we compared sleeping sites to 'non-sleeping' sites (areas along the riverbank where proboscis monkey groups were never observed to sleep throughout the study). At this larger study scale, we aimed to determine the importance of the entire sleeping site.

In accordance to the 'antipredation' hypothesis, we expected that: (1) selected sleeping trees would differ from surrounding (non-sleeping) trees by providing proboscis monkeys better structural traits against predators at night (i.e. tall trees, high first branch); (2) sleeping sites would differ from non-sleeping sites, by offering groups better structural features to reduce night predation risks (i.e. more canopy connectivity and density); (3) sleeping tree characteristics selected for would vary in relation to the social composition of the proboscis monkey group (one-male or all-male), expecting more antipredation features in one-male group sleeping trees as this social group contains more young individuals which are most vulnerable to predation; and (4) as a response to the predation pressure at night, individuals from different age-sex classes would use sleeping trees differently – with vulnerable juveniles and females using higher locations in the sleeping trees. Regarding the 'potential food abundance' hypothesis, we expected that: (5) selected sleeping trees would differ from surrounding trees and (6) sleeping sites would differ from non-sleeping sites, with the former providing proboscis monkeys with a higher abundance of leaves, fruits and flowers.

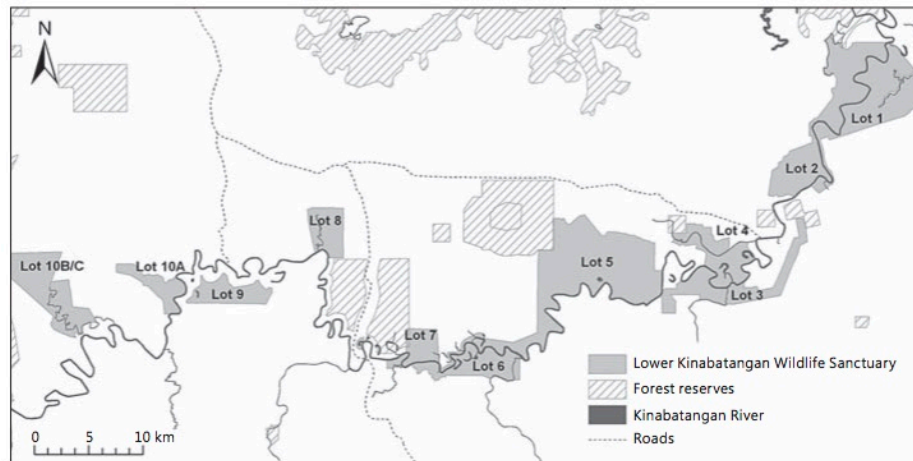


Fig. 1. Map of the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary with the 10 forest blocks/lots along the Kinabatangan River.

Materials and Methods

Study Site

We conducted our study from November 2011 to January 2012 in riverine forests along the Kinabatangan River, in the Malaysian State of Sabah. The Kinabatangan River is the largest river in Sabah, flowing from 560 km inland to the east coast and the Sulu Sea. In our survey area, the river is approximately 100 m wide. The major habitat types of the Kinabatangan flood plain are lowland dry forest, seasonally flooded forest and mangrove forest [Abram et al., 2014]. Our study took place inside lots 5 and 7 of the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary (fig. 1). The topography of the study area is mostly flat with low altitudes (under 30 m a.s.l.; Google Earth, 2015).

During our study, we measured daily temperatures, rainfall and river water level at the research station. Monthly rainfall and the mean river level varied from 386.5 mm and 3.19 m ($\pm$ SD = 0.9) in November 2011 to 535.8 mm and 4.98 m ($\pm$ SD = 1.3) in January 2012, respectively. Mean monthly minimum and maximum temperatures were constant throughout the study, reaching 24.5 ($\pm$ SD = 0.8) and 32.5 ($\pm$ SD = 3.1) °C. At the beginning of the study, sunrise and sunset took place at 05.54 and 17.47 h, and at the study end at 06.25 and 18.16 h (see Sandakan <http://www.sunrise-and-sunset.com/>).

Data Collection

Use of Sleeping Trees by Individuals

Proboscis monkeys are known to forage inside the forest during the day and come back along water bodies to sleep at night [Matsuda et al., 2011]. This pattern allows researchers to conduct boat surveys before dusk and find groups at their sleeping sites. Therefore, we travelled along the Kinabatangan River every late afternoon in a section between the Danau Girang Field Centre (5°24'48.23" N, 118°2'17.94" E) to a point located 6.5 km upstream. We focused our observations on the north riverbank and randomly selected one of the proboscis monkey groups present on the river edge. We (V. Thiry) conducted behavioural observations from 17.00 h – the time of day when groups start to settle at their sleeping site locations – until 18.00–18.15 h. We used the instantaneous scan-sampling method [Altmann, 1974], with a 15-min interval. During each scan, the observer recorded the age-sex class of each individual, its behavioural activity (resting, feeding, moving, other [Matsuda et al., 2009]) and its height in tree (0–10 m; 11–20 m; 21–30 m;

>30 m). We distinguished group individuals by using the descriptions of age-sex classes made by Bennett and Sebastian [1988]. Moreover, we differentiated adult females that were alone from those carrying an infant. Because we did not have the opportunity to follow groups during the day, we were not able, even over consecutive days of observation, to identify individuals and differentiate groups from each other. Therefore, we only considered the group organization and distinguished two types of social composition: 'one-male' groups and 'all-male' groups.

We recorded the sleeping site location with a hand-held GPS unit (Garmin GPS 60CSx). Every morning, we revisited the sleeping site of the previous night to conduct further behavioural observations on the same group (from 06.00 to 07.00 h). After individuals had left the river edge to move inland, we characterized the sleeping habitat, using the plot-sampling method [Ganzhorn, 2003]. To delineate the plots (20 × 20 m), we positioned the sleeping tree in the centre and orientated plots in the same cardinal directions (by using a compass). When a group used several sleeping trees, we defined a point at a mean distance between them as the centre of the plot. When a sleeping tree was selected less than 10 m from the riverbank, we considered the river as the edge of the plot. In each plot, we surveyed every tree with a circumference at breast height (CBH) ≥ 30 cm.

Terminology

Terms were defined as follows:

- 1 *Sleeping tree*: a tree in which proboscis monkeys spend the night.
- 2 *Sleeping site*: an area (plot of 400 m²) along the river where proboscis monkeys stay overnight; a sleeping site consists of one or several sleeping tree(s) in its centre and surrounding trees.
- 3 *Surrounding tree*: a tree located in a sleeping site but in which proboscis monkeys do not sleep.
- 4 *Non-sleeping site*: a randomly chosen area (plot of 400 m²) along the river where proboscis monkeys were never observed to sleep during the study; a non-sleeping site contains only control trees.
- 5 *Control tree*: a tree located in non-sleeping sites.

Sleeping Tree Species: Selection or Avoidance

We aimed to test whether the tree species was an important criterion in the selection of night sleeping trees by proboscis monkeys. We calculated the species selectivity (S_i) by comparing the proportion of use (U_i) of each species with the availability (A_i) of trees in (sleeping and non-sleeping) sites along the riverside. We used the following formula:

$$S_i = U_i / A_i$$

where U_i is the number of sleeping trees of species i divided by the total number of sleeping trees, and A_i is the number of trees of species i in plots divided by the total number of trees in plots. We considered that S_i scores > 1 indicate a positive selection of the species i in the sleeping choice and S_i scores < 1 indicate an avoidance of this species [Feilen and Marshall, 2014].

Sleeping Site Characteristics

In each sleeping site, we distinguished two types of trees: sleeping trees and surrounding trees. We identified each tree – sleeping and surrounding – to the species level and recorded 15 different variables (table 1).

Non-Sleeping Site Characteristics

We could determine different 'non-sleeping sites' along the riverside where proboscis monkeys never slept during the study. We randomly chose 12 plots to characterize the habitats by a grid created on the Software Geospatial Modeling Environment ArcGIS 9.3. We only studied trees located ≤ 50 m away from the riverbank, as a previous study showed that proboscis monkeys generally do not sleep further inland [Bernard et al., 2011]. In these 'non-sleeping plots', we identified each tree (CBH ≥ 30 cm) to the species level, measured the same 15 variables and used the same methods as those described for sleeping sites.

Table 1. Variables (physical structure and potential food abundance) measured for each tree

Variables	Descriptions	Methods of measurement
CBH	Circumference (cm) at breast height of the tree trunk	Measuring tape
IBGIRTH	Categories of the first branch girth	Estimated by eye. Scale of 1–5: 1 = 0–30 cm; 2 = 31–60 cm; 3 = 61–90 cm; 4 = 91–120 cm; 5 = 121–150 cm
TH	Tree height (m)	Clinometer
IBH	Height (m) of the first branch	Clinometer
CTY	Arboreal crown connectivity with other trees	Estimated by eye. Scale of 0–4, with 0 = the tree is completely isolated, 1 = 25% of the crown edges overlap surrounding trees, 2 = 50%, 3 = 75%, and 4 = the crown edges completely overlap with surrounding trees
DSTY	Tree crown density	Estimated by eye. Scale of 0–4, with 0 = a tree without leaves, 1 = a tree with 75% of sky visibility throughout the crown, 2 = 50%, 3 = 25%, and 4 = a tree in which it is difficult to see the sky throughout the crown
RDIST	Distance (m) from riverbank	Long measuring tool
YOUNGL	Young leaf abundance	Scale 0–4 for the relative abundance of the item visible in the crown, where 0 = 0%, 1 = 1–25%, 2 = 26–50%, 3 = 51–75%, and 4 >75%
MATL	Mature leaf abundance	
SENEL	Senescent leaf abundance	
BUDS	Bud abundance	
FLOWERS	Flower abundance	
MATFRU	Mature fruit abundance	
UNFRU	Unripe fruit abundance	
VINES	Vine absence or presence	0 indicates absence and 1 presence

Data Analysis

We used the non-parametric Mann-Whitney Wilcoxon test to analyse the comparisons for physical structure and food abundance variables between sleeping, surrounding and control trees. To carry out these tests, we used the R Statistical Software version 3.1.2 (2014). χ^2 tests were computed on Excel version 14.0.0 (2010) to compare binary variables (e.g. absence/presence of vines in canopy) and to identify different proportions. We also conducted discriminant analysis and logistic regression to examine the main features distinguishing sleeping sites used by one-male groups from non-sleeping sites. For this, we used SPSS version 19 (2011). We always used a statistical significance of $p < 0.05$.

Results

Use of Sleeping Trees by Groups

During the study, we conducted 36 morning and 47 afternoon surveys. We conducted 1,333 observations at sleeping sites – 453 in the morning and 880 in the afternoon. The number of occurrences for each kind of social group we observed is 32 one-male (mean $\pm$ SD = 13 ± 4 individuals) and 5 all-male groups (mean $\pm$ SD = 10 ± 2 individuals). Generally individuals within a group did not sleep together in a single sleeping tree but tended to use an average of 3 (ranging from 1 to 8) sleeping

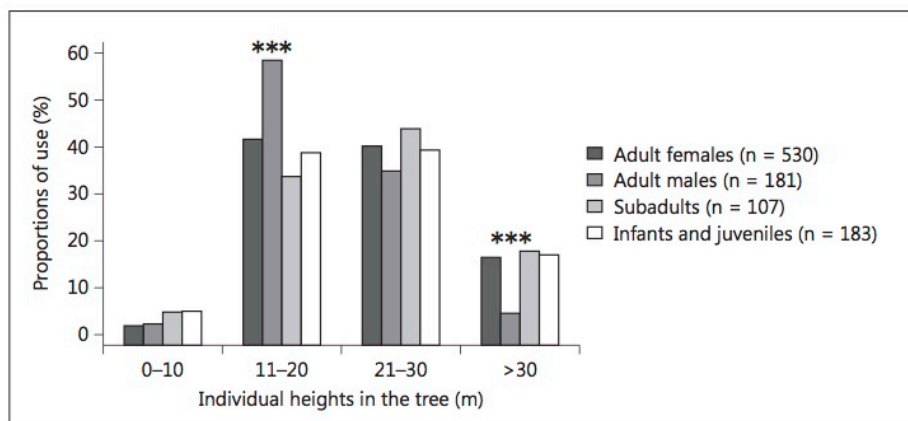


Fig. 2. Use of different heights in the same tree by proboscis monkey individuals of different age-sex classes at sleeping sites along the Kinabatangan River. Adult females refer to adult females with and without infants, and subadults refer to both sexes. *** $p < 0.001$.

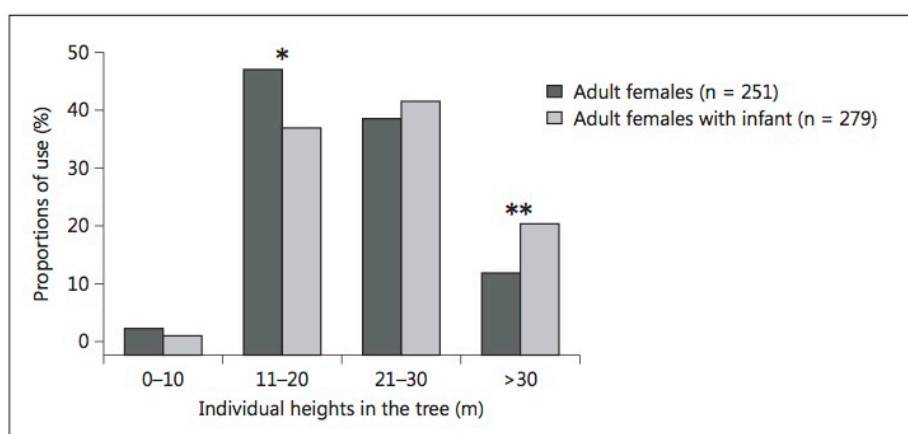


Fig. 3. Use of different heights in the same tree by adult female proboscis monkeys with or without infants at sleeping sites along the Kinabatangan River. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

trees. Individuals positioned themselves at different heights in a tree according to their age-sex class ($\chi^2 = 37.39$; $n = 1,001$; d.f. = 9; $p < 0.001$) (fig. 2). Adult males stayed more frequently at lower heights (between 11 and 20 m high) than other individuals ($\chi^2 = 20.81$; $n = 1,001$; d.f. = 1; $p < 0.001$) and used the top of the tree canopy (above 30 m) less frequently than others ($\chi^2 = 18.07$; $n = 1,001$; d.f. = 1; $p < 0.001$).

When we distinguished between the two categories of adult females – with or without infant – we observed a difference in tree height used ($\chi^2 = 10.64$; $n = 530$; d.f. = 3; $p < 0.05$) (fig. 3). Indeed, adult females with infants stayed at higher positions

Table 2. Tree availability in plots, use and selectivity of sleeping trees by species along the Kinabatangan River

Family	Species	Number of times used	Proportion of use, %	Number of trees in plots	Proportion availability, %	Selectivity coefficient
Malvaceae	<i>Colona serratifolia</i>	23	28.40	106	22.94	1.24
Malvaceae	<i>Pterospermum diversifolium</i>	15	18.52	19	4.11	4.50
Moraceae	<i>Ficus racemosa</i>	14	17.28	12	2.60	6.65
Rubiaceae	<i>Nauclea orientalis</i>	13	16.05	26	5.63	2.85
Apocinaceae	<i>Alstonia</i> spp.	3	3.70	5	1.08	3.42
Anacardiaceae	<i>Dracontomelon dao</i>	3	3.70	8	1.73	2.14
Malvaceae	<i>Pterospermum elongatum</i>	2	2.47	22	4.76	0.52
Verbenaceae	<i>Vitex pinnata</i>	2	2.47	12	2.60	0.95
Hypericaceae	<i>Cratoxylum cochinchinense</i>	1	1.23	3	0.65	1.90
Leguminosae	<i>Dialium indum</i>	1	1.23	0	0.00	0.00
Moraceae	<i>Ficus benjamina</i>	1	1.23	1	0.22	5.70
Malvaceae	<i>Kleinhovia hospita</i>	1	1.23	79	17.10	0.07
Tetramelaceae	<i>Octomeles sumatrana</i>	1	1.23	0	0.00	0.00
Unknown	Unknown	1	1.23	17	3.68	0.34

Table 3. Comparisons of physical structure and potential food abundance between *Ficus* sleeping trees (ST) and *Ficus* non-sleeping trees (T and cT) along the north riverbank of the Kinabatangan River

Variables	<i>Ficus</i> ST (n = 15)	<i>Ficus</i> T and cT (n = 13)	Statistical significance	
CBH, cm	296.79±144.15	127.77±67.42	W = 171	***
1BGIRTH	3.07±1.28	2±1.13 (n = 12)	W = 132	*
TH, m	34.14±13.30	22.47±8.48	W = 149	*
1BH, m	12.76±5.07	10.79±5.92 (n = 12)	W = 99	n.s.
CTY	2.67±0.99	1±0.61	W = 181	***
DSTY	1.57±0.56	1.27±0.60	W = 128.5	n.s.
RDIST, m	15.59±10.67	32.65±19.16	W = 50.5	*
YOUNGL	0.3±0.1	0.25±0 (n = 12)	W = 108	n.s.
MATL	2.2±0.73	1.88±0.06 (n = 12)	W = 116.5	n.s.
SENEL	0.25±0	0.25±0 (n = 12)	W = 90	–
BUDS	0±0	0±0 (n = 12)	W = 90	–
FLOWERS	0±0	0±0 (n = 12)	W = 90	–
MATFRU	0.22±0.27	0.02±0.07 (n = 12)	W = 137.5	**
UNFRU	0.33±0.49	0.15±0.17 (n = 12)	W = 115	n.s.
VINES			$\chi^2 = 1.1966$, d.f. = 1	n.s.
Yes (n = 1)	0 (0%)	1 (100%)		
No (n = 27)	15 (56%)	12 (44%)		

T = Surrounding tree; cT = control tree. Data are means ± SD (even for ranked variables, except for VINES). Wilcoxon test (W) except for the VINES variable (χ^2 test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. = non-significant, i.e. $p \geq 0.05$. See the variable descriptions in table 1. The percentages are the relative risks of having vines in tree crown.

Table 4. Comparisons of physical structure and potential food abundance between proboscis monkey sleeping trees (ST) and surrounding trees (T), along the north riverbank of the Kinabatangan River

Variables	ST (n = 81)	T (n = 303)	Statistical significance	
CBH, cm	159.32±101.50	72.20±45.86	W = 4,111.5	***
1BGIRTH	2.10±1.18 (n = 74)	1.25±0.55 (n = 285)	W = 5,978	***
TH, m	27.40±9.92	15.53±8.00 (n = 301)	W = 3,938.5	***
1BH, m	11.73±5.06 (n = 76)	7.86±5.10 (n = 281)	W = 5,852	***
CTY	2.10±1.05	1.86±1.06 (n = 301)	W = 10,669.5	n.s.
DSTY	2.18±0.77	2.03±0.87 (n = 301)	W = 11,019	n.s.
RDIST, m	9.57±7.39	16.24±11.79	W = 16,434.5	***
YOUNGL	0.27±0.07 (n = 80)	0.27±0.10 (n = 238)	W = 9,531.5	n.s.
MATL	2.30±0.74 (n = 80)	2.06±0.76 (n = 238)	W = 7,707.5	**
SENEL	0.26±0.07 (n = 80)	0.26±0.04 (n = 238)	W = 9,241.5	n.s.
BUDS	0.04±0.14 (n = 80)	0.06±0.17 (n = 238)	W = 9,932.5	n.s.
FLOWERS	0.10±0.30 (n = 80)	0.03±0.13 (n = 238)	W = 8,791.5	n.s.
MATFRU	0.30±0.47 (n = 80)	0.07±0.19 (n = 238)	W = 5,883.5	***
UNFRU	0.15±0.28 (n = 80)	0.07±0.19 (n = 238)	W = 7,427	***
VINES			$\chi^2 = 5.5624$, d.f. = 1	*
Yes (n = 73)	8 (11%)	65 (89%)		
No (n = 311)	73 (23%)	238 (77%)		

Data are means $\pm$ SD (even for ranked variables, except for VINES). Wilcoxon test (W) except for the VINES variable (χ^2 test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. = non-significant, i.e. $p \geq 0.05$. See the variable descriptions in table 1. The percentages are the relative risks of having vines in tree crown.

(above 30 m) more frequently than those without infants ($\chi^2 = 6.92$; $n = 530$; d.f. = 1; $p < 0.01$). Females without infants more commonly used heights between 11 and 20 m ($\chi^2 = 5.54$; $n = 530$; d.f. = 1; $p < 0.05$).

Sleeping Tree Species: Selection or Avoidance

We observed 81 sleeping trees (14 species, 10 families) for proboscis monkeys in 26 nights. The 4 major sleeping tree species were *Colona serratifolia*, *Pterospermum diversifolium*, *Ficus racemosa* and *Nauclea orientalis* (table 2). Together they accounted for 80% of the sleeping trees ($n = 65$). *C. serratifolia* was the most used tree species for sleeping ($n = 23$). However, this high number does not reflect a process of selection (selectivity coefficient = 1.24) but only corresponds to the high availability of the tree species along the riverside. However, *Kleinhovia hospita* was also highly available on the riverbank but this species was used only once as sleeping tree. Proboscis monkeys therefore seem to avoid this species (selectivity coefficient = 0.07) in their choice of a sleeping tree. *F. racemosa* was the most preferred sleeping tree species (selectivity coefficient = 6.65). *F. benjamina* also seemed to be selected by proboscis monkeys, but as we only recorded 1 sleeping tree belonging to *F. benjamina*, this choice requires further investigations. By comparing the physical characteristics between *Ficus* sleeping trees and other available *Ficus* trees (sur-

Table 5. Comparisons of physical structure and potential food abundance between sleeping trees selected by one-male groups (OMG ST) and sleeping trees selected by all-male groups (AMG ST) along the north riverbank of the Kinabatangan River

Variables	OMG ST (n = 44)	AMG ST (n = 9)	Statistical significance	
CBH, cm	156.43±115.58	126.44±45.10	W = 223.5	n.s.
1BGIRTH	2.25±1.26 (n = 40)	2.00±0.87	W = 190.5	n.s.
TH, m	27.91±11.98	27.31±9.45	W = 201	n.s.
1BH, m	11.88±5.60 (n = 40)	11.39±4.39	W = 184.5	n.s.
CTY	2.06±1.17	1.94±0.73	W = 205.5	n.s.
DSTY	2.30±0.69	1.33±0.56	W = 338.5	***
RDIST	9.55±9.02	8.65±5.47	W = 186	n.s.
YOUNGL	0.27±0.09 (n = 43)	0.25±0.00	W = 211.5	n.s.
MATL	2.24±0.81 (n = 43)	1.94±0.46	W = 253	n.s.
SENEL	0.26±0.07 (n = 43)	0.31±0.11	W = 156	n.s.
BUDS	0.04±0.16 (n = 43)	0.03±0.08	W = 190.5	n.s.
FLOWERS	0.16±0.40 (n = 43)	0.03±0.08	W = 215	n.s.
MATFRU	0.25±0.46 (n = 43)	0.31±0.48	W = 167.5	n.s.
UNFRU	0.12±0.33 (n = 43)	0.17±0.13	W = 121.5	*
VINES			$\chi^2 = 5.5624$, d.f. = 1	n.s.
Yes (n = 8)	8 (100%)	0 (0%)		
No (n = 45)	36 (80%)	9 (20%)		

Data are means ± SD (even for ranked variables, except for VINES). Wilcoxon test (W) except for VINES variable (χ^2 test). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, n.s. = non-significant, i.e. $p \geq 0.05$. See the variable descriptions in table 1. The percentages are the relative risks of having vines in tree crown.

rounding and control trees together) in the study area, we observed significant differences for 6 variables (table 3). *Ficus* sleeping trees were closer to the riverbank, taller, with a larger trunk and first branch, and had a more connected crown with more ripe fruits.

Sleeping Tree Characteristics

By comparing the 15 variables between sleeping trees and surrounding trees, we identified 9 significant differences (table 4). Sleeping trees had a wider trunk circumference (CBH), and were located closer to the riverbank than surrounding trees. They were taller than surrounding trees and had higher and wider first branches. The abundance of mature leaves, unripe and mature fruits were greater in sleeping trees than in surrounding trees, and fewer sleeping trees had vines in their crown.

During our behavioural observations at sleeping sites, we recorded the social organization of proboscis monkey groups: one-male or all-male groups. By comparing sleeping trees used by one-male (n = 44) and all-male groups (n = 9), we observed that the crown density and the abundance of unripe fruits were the only two features varying between them. The canopy cover was significantly thicker in one-male group sleeping trees while the unripe fruit abundance was lower (table 5).

Table 6. Comparisons of physical structures and potential food abundance between surrounding trees (T) located in proboscis monkey sleeping sites and control trees (cT) located in non-sleeping sites, along the north riverbank of the Kinabatangan River

Variables	T (n = 303)	cT (n = 159)	Statistical significance	
CBH, cm	72.20±45.86	72.87±35.86	W = 22,468.5	n.s.
1BGIRTH	1.25±0.55 (n = 285)	1.33±0.52 (n = 153)	W = 19,879	*
TH, m	15.53±8.00 (n = 301)	15.79±6.38	W = 22,333.5	n.s.
1BH, m	7.86±5.10 (n = 281)	6.79±3.90 (n = 152)	W = 23,609.5	n.s.
CTY	1.86±1.06 (n = 301)	1.92±1.23	W = 23,804.5	n.s.
DSTY	2.03±0.87 (n = 301)	1.98±0.83	W = 24,873	n.s.
RDIST, m	16.24±11.79	24.11±13.92	W = 16,012.5	***
YOUNGL	0.27±0.10 (n = 238)	0.26±0.07	W = 19,163	n.s.
MATL	2.06±0.76 (n = 238)	1.90±0.82	W = 20,771	n.s.
SENEL	0.26±0.04 (n = 238)	0.25±0.03	W = 19,080.5	n.s.
BUDS	0.06±0.17 (n = 238)	0.03±0.11	W = 19,878.5	n.s.
FLOWERS	0.03±0.13 (n = 238)	0.03±0.09	W = 19,166.5	n.s.
MATFRU	0.07±0.19 (n = 238)	0.15±0.27	W = 15,673	***
UNFRU	0.07±0.19 (n = 238)	0.11±0.24	W = 17,722	n.s.
VINES			$\chi^2 = 3.3012$, d.f. = 1	n.s.
Yes (n = 88)	65 (74%)	23 (26%)		
No (n = 374)	238 (64%)	136 (36%)		

Data are means $\pm$ SD (even for ranked variables, except for VINES). Wilcoxon test (W) except for the VINES variable (χ^2 test). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, n.s. = non-significant, i.e. $p \geq 0.05$. See the variable descriptions in table 1. The percentages are the relative risks of having vines in tree crown.

Sleeping Site Characteristics

Bivariate Analyses

We compared the 15 variables between surrounding trees located in sleeping sites and control trees studied in non-sleeping sites (table 6). Surrounding trees were closer to the riverbank, contained fewer mature fruits and had a thinner first branch than control trees.

Multivariate Analyses

At a wider scale, we focused on sleeping sites (including sleeping and surrounding trees) used by one-male groups to establish a model that discriminates them from non-sleeping sites (including control trees). A multivariate analysis compared these two subsets and brought forward the main tree variables distinguishing them. The results obtained through the discriminant analysis are highly significant ($\chi^2 = 117.73$; d.f. = 9; $p < 0.001$). The analysis extracted 9 discriminant variables (CBH, 1BH, CTY, DSTY, RDIST, MATL, BUDS, FLOWERS and MATFRU – see table 7 with the bivariate outcomes), which together allow us to classify a site as sleeping or non-sleeping, with a probability of 78.81%. We did not include VINES because categorical variables are not allowed in discriminant analyses. We then conducted a logistic regression (backward elimination) with VINES and the 9 variables retained by the first analysis. This second model highlighted a combina-

Table 7. Predictors of sleeping sites used by one-male groups resulting from the first discriminant analysis and VINES: bivariate tests (n = 292).

Predictors	ST+T (n = 133)	cT (n = 159)	p
CBH, cm	84.11 ± 71.39	72.87 ± 35.86	0.101
1BH, m	8.35 ± 6.13 (n = 126)	6.79 ± 3.90 (n = 152)	0.014
CTY	1.86 ± 1.06	1.92 ± 1.23	0.006
DSTY	2.21 ± 0.80	1.98 ± 0.83	0.013
RDIST, m	13.02 ± 9.61 (n = 124)	24.11 ± 13.92	<0.001
MATL	2.08 ± 0.80 (n = 124)	1.90 ± 0.81	0.055
BUDS	0.07 ± 0.21 (n = 124)	0.03 ± 0.11	0.031
FLOWERS	0.08 ± 0.27 (n = 124)	0.03 ± 0.09	0.019
MATFRU	0.06 ± 0.16 (n = 124)	0.15 ± 0.27	<0.001
VINES			0.344
Yes (n = 48)	25 (52%)	23 (48%)	
No (n = 244)	108 (44%)	136 (56%)	

ST = Sleeping trees; T = surrounding trees; cT = control trees. p values assessed by t test except for VINES (Fisher's exact test). The percentages are the relative risks of having vines in tree crown.

tion of 6 significant variables (CBH, 1BH, CTY, RDIST, BUDS, MATFRU) contributing to a good prediction (76.2%) of both sites ($\chi^2 = 116.91$; d.f. = 6; $p < 0.001$) (table 8).

Discussion

In this study, we found that proboscis monkeys were selecting the physical features of their sleeping tree, as well as the abundance of foliage and fruit in the tree. We showed that surrounding trees also influence their selection of sleeping sites along the riverbank. We suggest that the antipredation strategy is the main factor for explaining proboscis monkey sleeping site use and choice, while the food abundance factor requires further investigations.

Many factors may influence sleeping site selection in primates [Di Bitetti et al., 2000; Phoonjampa et al., 2010; Teichroeb et al., 2012]. Here we investigated the selection of sleeping sites by proboscis monkeys along the Kinabatangan River by studying the species, physical structure and potential food availability of sleeping and surrounding trees. Staying higher in the canopy is an advantage in terms of predator avoidance as this reduces the risk of being attacked by a terrestrial animal [van Schaik et al., 1983; Anderson, 1984; Reichard, 1998]. We recorded significant differences between age-sex categories in the way proboscis monkey group members occupy different heights within a sleeping tree. The more vulnerable individuals, such as infants and juveniles, slept higher in the canopy than adult males. We also observed that adult females with infants often occupied higher places than adult females that were alone. This was, presumably, because the higher sites provided better protection from predators for the infants. These patterns of sleeping tree use have also been observed in

Table 8. Predictors of sleeping sites used by one-male groups (n = 269 after exclusion of missing values)

Predictors	Coefficient	Odds ratio	CI	p
CBH	0.009	1.009	1.001–1.017	0.012
1BH	0.103	1.108	1.025–1.199	0.010
CTY	–0.440	0.644	0.473–0.878	0.005
RDIST	–0.111	0.895	0.867–0.923	<0.001
BUDS	3.316	27.539	3.079–246.78	0.003
MATFRU	–4.629	0.010	0.001–0.071	<0.001
Intercept	1.297	3.659		0.005

Logistic regression model with a backward stepwise selection of the predictors. In this model we used VINES and the 9 predictors selected by the previous discriminant analysis (level of significance ≤ 0.1). DSTY, MATL, FLOWERS and VINES are excluded from the initial list because they were not statistically significant. CI = 95% confidence interval.

other species, such as the Sumatran and Bornean orang-utans (*Pongo abelii* and *P. pygmaeus*) [Sugardjito, 1983; Setiawan et al., 1996] and the lar gibbon (*Hylobates lar*) [Reichard, 1998].

Proboscis monkeys are known to return to spend the night along the riverbank. Higher food availability and lower air temperatures in riverine habitats are unconvincing factors to explain this river refuging, as these features are not strongly different from inland habitats [Matsuda et al., 2011]. It is more generally considered to be an antipredation strategy. By selecting a tree at the riverside, individuals have to guard only the landward side, which reduces the risks of surprise predator attacks [Matsuda et al., 2008b]. When the river water level was high at our study site (after several rainy days), we could not find proboscis monkey groups sleeping along the edge of the river. We suggest that flooded forest grounds provide proboscis monkeys with the required protection against terrestrial predators, so that they did not need to travel to the riverbank to find sleeping site refuges [Matsuda et al., 2010].

While the proximity to the river was a determining factor in sleeping site choice, we also emphasized the importance of some physical characteristics of trees. For example, groups preferentially chose tall and large-trunked sleeping trees. These characteristics correspond to proboscis monkeys' choice at other study sites [Bernard et al., 2011; Feilen and Marshall, 2014]. We found sleeping trees had wider first branches, as did Bernard et al. [2011]. Large trees and wide branches may provide comfort and security to individuals, allowing them a better position and reducing the risks of falling, especially when faced with strong winds or wet weather [Di Bitetti et al., 2000; Bernard et al., 2011]. The strong sexual dimorphism in proboscis monkeys, with adult males (20 kg) weighing twice as much as females (10 kg) [Bennett and Sebastian, 1988; Yeager, 1990], could explain their pattern of sleeping tree use – an adult male requiring larger, and most often lower, branches to support its weight. Social relations might also be improved in large sleeping trees, by allowing several or all group members to stay together [Di Bitetti et al., 2000; Bernard et al., 2011]. Feilen and Marshall

[2014] suggested proboscis monkeys might choose tall emergent sleeping trees to reduce mosquito disturbance and therefore minimize the risk of disease. The selection of tall trees also means that the primates are safer as they can sleep further away from terrestrial predators [Cheyne et al., 2012]. We found groups selected trees with first branches higher than surrounding trees and less often with vines in their crown. Both features also support the 'antipredation' hypothesis. Indeed, vines could hide snakes – potentially predating on proboscis monkey infants or juveniles [Matsuda et al., 2008b] – while choosing trees with a higher first branch may reduce the accessibility by terrestrial predators [Day and Elwood, 1999; Liu and Zhao, 2004; Li et al., 2006; Duarte and Young, 2011].

Overall, we did not find that sleeping trees had a denser canopy cover than other trees in the forest, which is similar to the findings of Bernard et al. [2011] and Feilen and Marshall [2014]. However, by focusing on the social organization of the group, we observed that leaf coverage might influence their choice of sleeping trees. Indeed, the crown foliage was denser in sleeping trees used by one-male groups than in those used by all-male groups. This selection might reflect an antipredation strategy because a thicker canopy could better hide more vulnerable individuals from terrestrial predators [Teichroeb et al., 2012]. This choice seems particularly relevant for one-male groups as they include more vulnerable individuals, such as juveniles and infants. In all-male groups, where several adult males are able to protect other group members, a dense canopy might play a less significant role in predation avoidance. The selection of different trees for sleeping and feeding is another antipredation strategy. Fruits could also be used by predators as an indication of the presence of prey [Sugardjito, 1983]. We suggest that one-male groups may follow this strategy by choosing sleeping trees with less unripe fruits than those chosen by all-male groups. Nevertheless, further studies should test such hypotheses as our sampling effort for sleeping trees used by all-male groups was small ($n = 9$). Finally, connectivity between trees appears to be a controversial factor between study sites. While proboscis monkeys along the Garama River (Sabah, Malaysia) preferred connecting trees [Bernard et al., 2011], they tended to select emergent sleeping trees without connections to surrounding trees at Tolak River (West Kalimantan, Indonesia) [Feilen and Marshall, 2014]. In our study, bivariate comparisons show that connectivity is not an influencing factor that distinguishes sleeping trees from surrounding trees. However, multivariate analyses suggest this feature is crucial when considering the site in its entirety.

We expected sleeping sites would include trees with some antipredator characteristics such as better crown connectivity, denser foliage cover or higher first branches. However, we found surrounding trees and control trees were relatively similar to each other, with the exception of the following 3 variables: surrounding trees were closer to the riverbank, contained fewer mature fruits and had a thinner first branch. Nevertheless, when we conducted multivariate analyses with sleeping sites used by one-male groups and non-sleeping sites, we obtained interesting results. The models retained several combined variables that distinguished both types of sites (sleeping or non-sleeping). The real interest of this multivariate method was to create a model that might be useful to determine the significance of areas by only assessing few variables (CBH, 1BH, CTY, RDIST, BUDS and MATFRU). The model might potentially reduce the number of measurements researchers would have to collect for characterizing sleeping sites of proboscis monkeys.

We also considered the ‘potential food abundance’ hypothesis by investigating the abundance of leaves, fruits and flowers in sleeping and surrounding trees. We found that individuals appeared to select sleeping trees with more mature leaves, unripe and ripe fruits than surrounding trees. By referring to a previous study conducted in the Kinabatangan region [Matsuda et al., 2009] as well as to our feeding records at sleeping sites, we noticed that more than 80% of the trees (sleeping, surrounding and control) belonged to species that proboscis monkeys are known to consume. However, it is too early to be sure that food abundance is a significant factor in sleeping site selection, as we considered leaf, fruit and flower abundances for all tree species present in our plots, whether they were consumed or not by proboscis monkeys at that time. Nevertheless, sleeping in trees rich in food items is the opposite of what other species do: the Sumatran orang-utan and the agile gibbon avoid sleeping in feeding trees and prefer to spend the night in close proximity [Sugardjito, 1983; Cheyne et al., 2012]. Future studies should investigate in depth the ‘food proximity’ hypothesis, by recording the distance between sleeping trees and the last and first feeding trees of the day. It is known that food availability, especially of fruits, influences proboscis monkeys’ daily path lengths and activity budget [Matsuda et al., 2009, 2014], and may impact their sleeping choices as well.

Our study shows that the physical structure of sleeping trees is a determining factor in the selection of sleeping sites by proboscis monkeys along the Kinabatangan River. Even if some sleeping tree species seemed to be preferred (e.g. *Ficus* spp.), their individual physical structure appeared to play a significant role in the selection process. These sleeping trees were tall, closer to the river, with a wide trunk and first branch, and had a more connected crown than non-sleeping trees (surrounding and control) from the same species. The multivariate model asserts the importance of the overall area – sleeping trees as well as surrounding trees – in the choice of sleeping sites by proboscis monkeys, a finding that should be considered in management decisions. While the antipredation strategy can explain many sleeping tree features observed in our study area, other factors such as comfort, disease avoidance, social interactions and, especially, food abundance should also be considered in the selection process.

Acknowledgements

We are grateful to the Sabah Wildlife Department for allowing us to carry out research in the Lower Kinabatangan Wildlife Sanctuary. We thank our research assistants; especially Bahrudin Resake, Saroto Payar, Petrieadi Ambo Tola and Samsir Laimun, as well as Josie D’Urban Jackson, Alice Miles, Becky Lawrence and Alexandre Laizé, for their help during data collection.

References

- Abram NK, Xofis P, Tzanopoulos J, MacMillan DC, Ancrenaz M, Chung R, Peter L, Ong R, Lackman I, Goossens B, Ambu L, Knight AT: (2014). Synergies for improving oil palm production and forest conservation in floodplain landscapes. *PLoS One* 9: e95388.
- Albert A, Savini T, Huynen MC (2011). Sleeping site selection and presleep behavior in wild pigtailed macaques. *American Journal of Primatology* 73: 1222–1230.
- Altmann J (1974). Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour* 49: 227–267.

194 Folia Primatol 2016;87:180–196
DOI: 10.1159/000449219

Thiry/Stark/Goossens/Slachmuylder/
Vercauteren Drubbel/Vercauteren

- Anderson JR (1984). Ethology and ecology of sleep in monkeys and apes. *Advances in the Study of Behaviour* 14: 165–229.
- Anderson JR (1998). Sleep, sleeping sites and sleep-related activities: awakening to their significance. *American Journal of Primatology* 46: 63–75.
- Barnett AA, Shaw P, Spironello WR, MacLarnon A, Ross C (2012). Sleeping site selection by golden-backed uacaris, *Cacajao melanocephalus ouakary* (Pitheciidae), in Amazonian flooded forests. *Primates* 53: 273–285.
- Bennett EL, Sebastian AC (1988). Social organization and ecology of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in mixed coastal forest in Sarawak. *International Journal of Primatology* 9: 233–255.
- Bernard H, Matsuda I, Hanya G, Ahmad AH (2011). Characteristics of night sleeping trees of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, Malaysia. *International Journal of Primatology* 32: 259–267.
- Chapman CA, Chapman LJ, McLaughlin RL (1989). Multiple central place foraging by spider monkeys: travel consequences of using many sleeping sites. *Oecologia* 79: 506–511.
- Cheyne SM, Höing A, Rinear J, Sheeran LK (2012). Sleeping site selection by agile gibbons: the influence of tree stability, fruit availability and predation risk. *Folia Primatologica* 83: 299–311.
- Cui L-W, Quan R-C, Xiao W (2006). Sleeping sites of black-and-white snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) at Baima Snow Mountain, China. *Journal of Zoology* 270: 192–198.
- Day RT, Elwood RW (1999). Sleeping site selection by the golden-handed tamarin *Saguinus midas midas*: the role of predation risk, proximity to feeding sites, and territorial defence. *Ethology* 105: 1035–1051.
- Di Bitetti MS, Vidal EML, Baldovino MC, Benesovsky V (2000). Sleeping site preferences in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella nigratus*). *American Journal of Primatology* 50: 257–274.
- Duarte MH, Young RJ (2011). Sleeping site selection by urban marmosets (*Callithrix penicillata*) under conditions of exceptionally high predator density. *International Journal of Primatology* 32: 329–334.
- Fan P-F, Jiang X-L (2008). Sleeping sites, sleeping trees, and sleep-related behaviors of black crested gibbons (*Nomascus concolor jingdongensis*) at Mt. Wuliang, Central Yunnan, China. *American Journal of Primatology* 70: 153–160.
- Fei H-L, Scott MB, Zhang W, Ma C-Y, Xiang Z-F, Fan P-F (2012). Sleeping tree selection of Cao Vit gibbon (*Nomascus nasutus*) living in degraded Karst Forest in Bangliang, Jingxi, China. *American Journal of Primatology* 74: 998–1005.
- Feilen KL, Marshall AJ (2014). Sleeping site selection by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in West Kalimantan, Indonesia. *American Journal of Primatology* 76: 1127–1139.
- Ganzhorn JU (2003). Habitat description and phenology. In *Field and Laboratory Methods in Primatology, a Practical Guide* (Setchell JM, Curtis DJ, eds.), pp 40–56. Cambridge, Cambridge University Press.
- Hankerson SJ, Franklin SP, Dietz JM (2007). Tree and forest characteristics influence sleeping site choice by golden lion tamarins. *American Journal of Primatology* 69: 976–988.
- Hausfater G, Meade BJ (1982). Alternation of sleeping groves by yellow baboons (*Papio cynocephalus*) as a strategy for parasite avoidance. *Primates* 23: 287–297.
- Li D, Grueter CC, Ren B, Zhou Q, Li M, Peng Z, Wei F (2006). Characteristics of night-time sleeping places selected by golden monkeys (*Rhinopithecus bieti*) in the Samage Forest, Baima Snow Mountain Nature Reserve, China. *Integrative Zoology* 1: 141–152.
- Liu Z-H, Zhao Q-K (2004). Sleeping sites of *Rhinopithecus bieti* at Mt. Fuhe, Yunnan. *Primates* 45: 241–248.
- Lutermann H, Verburgt L, Rendigs A (2010). Resting and nesting in a small mammal: sleeping sites as a limiting resource for female grey mouse lemurs. *Animal Behaviour* 79: 1211–1219.
- Matsuda I, Akiyama Y, Tuuga A, Bernard H, Clauss M (2014). Daily feeding rhythm in proboscis monkeys: a preliminary comparison with other non-human primates. *Primates* 55: 313–326.
- Matsuda I, Tuuga A, Akiyama Y, Higashi S (2008a). Selection of river crossing location and sleeping site by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, Malaysia. *American Journal of Primatology* 70: 1097–1101.
- Matsuda I, Tuuga A, Bernard H (2011). Riverine refuging by proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) and sympatric primates: implications for adaptive benefits of the riverine habitat. *Mammalian Biology* 76: 165–171.
- Matsuda I, Tuuga A, Higashi S (2008b). Clouded leopard (*Neofelis diardi*) predation on proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, Malaysia. *Primates* 49: 227–231.
- Matsuda I, Tuuga A, Higashi S (2009). The feeding ecology and activity budget of proboscis monkeys. *American Journal of Primatology* 71: 478–492.
- Matsuda I, Tuuga A, Higashi S (2010). Effects of water level on sleeping-site selection and inter-group association in proboscis monkeys: why do they sleep alone inland on flooded days? *Ecological Resources* 25: 475–482.
- Meijaard E, Nijman V (2000). The local extinction of the proboscis monkey *Nasalis larvatus* in Pulau Kaget Nature Reserve, Indonesia. *Oryx* 34: 66–70.

- Murai T (2006). Mating behaviors of the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*). *American Journal of Primatology* 68: 832–837.
- Phoonjampa R, Koenig A, Borries C, Gale G, Savini T (2010). Selection of sleeping trees in pileated gibbons (*Hylobates pileatus*). *American Journal of Primatology* 71: 1–9.
- Pontes AR, Soares ML, Mendes Pontes AR, Soares ML (2005). Sleeping sites of common marmosets (*Callithrix jacchus*) in defaunated urban forest fragments: a strategy to maximize food intake. *Journal of Zoology* 266: 55–63.
- Ramakrishnan U, Coss RG (2001). Strategies used by bonnet macaques (*Macaca radiata*) to reduce predation risk while sleeping. *Primates* 42: 193–206.
- Reichard U (1998). Sleeping sites, sleeping places, and presleep behavior of gibbons (*Hylobates lar*). *American Journal of Primatology* 46: 35–62.
- Sha JCM, Bernard H, Nathan S (2008). Status and conservation of proboscis monkeys (*Nasalis larvatus*) in Sabah, East Malaysia. *Primate Conservation* 23: 107–120.
- Setiawan E, Knott CD, Budhi S (1996). Preliminary assessment of vigilance and predator avoidance behavior of orangutans in Gunung Palung National Park, West Kalimantan, Indonesia. *Tropical Biodiversity* 3: 269–279.
- Smith AC, Knogge C, Huck M, Löttker P, Buchanan-Smith HM, Heymann AW (2007). Long-term patterns of sleeping site use in wild saddleback (*Saguinus fuscicollis*) and mustached tamarins (*S. mystax*): effects of foraging, thermoregulation, predation, and resource defense constraints. *American Journal of Physical Anthropology* 134: 340–354.
- Stark DJ, Nijman V, Lhota S, Robins JG, Goossens B (2012). Modeling population viability of local proboscis monkey *Nasalis larvatus* populations: conservation implications. *Endangered Species Research* 16: 31–43.
- Sugardjito J (1983). Selecting nest-sites of Sumatran orang-utans, *Pongo pygmaeus abelii* in the Gunung Leuser National Park, Indonesia. *Primates* 24: 467–474.
- Teichroeb JA, Holmes TD, Sicotte P (2012). Use of sleeping trees by ursine colobus monkeys (*Colobus vellerosus*) demonstrates the importance of nearby food. *Primates* 53: 287–296.
- Van Schaik CP, van Noordwijk M, Warsono B, Sutrisno E (1983). Party size and early detection of predators in Sumatran forest primates. *Primates* 24: 211–221.
- Von Hippel FA (1998). Use of sleeping trees by black and white colobus monkeys (*Colobus guereza*) in the Kakamega Forest, Kenya. *American Journal of Primatology* 45: 281–290.
- Yeager CP (1990). Proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) social organization: group structure. *American Journal of Primatology* 20: 95–106.

**© Free Author
Copy - for per-
sonal use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distrib-
ute the PDF will be granted
against payment of a per-
mission fee, which is based
on the number of accesses
required. Please contact
permission@karger.com

10.3 Livret de terrain « *Tree and vine species at Danau Girang Field Centre* »

Durant ce travail, nous avons passé beaucoup de temps à identifier les espèces de plantes consommées par les nasiques dans le *LKWS*, ainsi que celles présentes au sein de nos plots botaniques. Nous collections des échantillons et prenions des photos. Une fois nos échantillons secs, nous les envoyions au *FRC* (Sandakan), où des experts botanistes (Dr. Joan T. Pereira et ses collègues) les identifiaient jusqu'à l'espèce.

A l'aide de cette base de données et de l'ensemble de nos photos, nous avons confectionné un livret reprenant les principales espèces d'arbres et de lianes présentes dans les lots 5,6 et 7 du *LKWS*. La réalisation de ce livret avait pour objectif de faciliter les prochaines recherches qui prendront place dans le Centre de recherche *DGFC*, permettant la reconnaissance des principales espèces de plantes disponibles dans ce site d'étude. Ce livret reprend 33 espèces d'arbres et de lianes, classées alphabétiquement, ainsi qu'une description des principales caractéristiques de chacune d'elles (ex : taille de l'arbre, type de feuilles, forme et couleur des fruits, couleur du bois, odeur, etc.) et des illustrations photos (ex : feuilles, fruits, fleurs, bois).

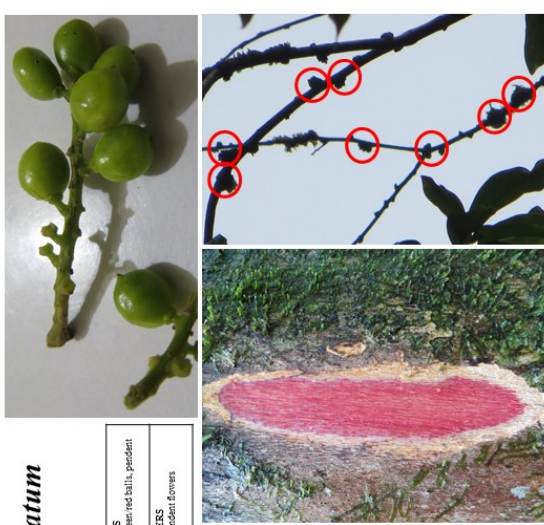
***Alstonia* sp.**
Family: Apocynaceae
Malay: Pulai

LEAVES Simple, whorled (4-7), very close secondary veins The under leaf surface is paler	FRUIT Tiny green red balls, pendent chain
BARK Light grey, latex, brown/yellowish White sap	FLOWERS Tiny pendent flowers




Antidesma punctulatum
Family: *Phyllanthaceae*
 Branches go in all directions. **Twigs have dots.**

LEAVES Simple, alternate, elliptical.	FRUIT Tiny green red balls, pendent chain
BARK Bleeds, peeling off From pink with large border, very characteristic.	FLOWERS Tiny pendent flowers




Cleistanthus oblongifolius

Family: Phyllanthaceae
Malay: Baubo

LEAVES	Simple, long alternate, elliptical, wavy Brownish twig
BARK	With dots, Flesh: yellow-pink, odor: aceticarum
FRUITS	Small green balls at the base of the twig
FLOWERS	Yellow at the base of twigs



Baccaurea tetrandra

Family: Phyllanthaceae
Malay: Kuman-Kuman

LEAVES	Simple, alternate, elliptical
BARK	Bark with characteristic holes Fruit: pale yellow
FRUITS	Red ball, hanging in chain Seeds covered with a purple jacket
FLOWERS	Whitish green



Colona serratifolia

Family: Malvaceae
Malay: Lomba

LEAVES	Simple, long elliptical, sharp end, dentate, hairy Young leaves: red
BARK	White with military pattern
FRUITS	Capsule with star shape
FLOWERS	Tiny pink flowers in panicles At the ends of branches



Cananga odorata

Family: Annonaceae
Malay: Kananga or ylang-ylang

LEAVES	Simple, alternate, long elliptical Glossy green
BARK	Smooth or rough. Good smell. Greyish white to silvery
FRUITS	Greenish black small balls (cf. olive) Clustered in the axils of branches
FLOWERS	Long yellow twisted petals, drooping down; Clustered at the leaf axil

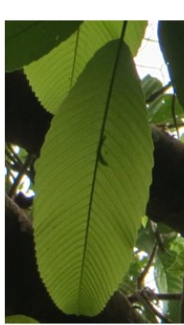




Cratogeomys merriami

Family: Hypnaceae
Malay: Geronggang

LEAVES	FRUIT
Simple, small, opposite, elliptical, entire Young leaves: red pink	
BARK	FLOWER
Smooth, orange, peeling off Fruit: purple with orange border	Red pink



Dillenia borneensis

Family: Dilleniaceae
Malay: Simpoh gajah

LEAVES	FRUIT
Large, simple, spirally arranged, pinnate, dense, light green Secondary veins very visible	
BARK	FLOWER
Smooth, orange, peeling off Fruit: Yellow with dark red vertical lines	

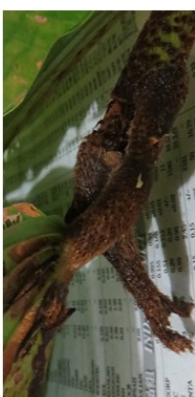


Dillenia excelsa

Family: Dilleniaceae
Malay: Simpoh laki

Small tree (< 10 m). Trunk often berris.

LEAVES	FRUIT
Large, simple, spirally arranged, pinnate, dense, dark green	
BARK	FLOWER
Smooth, reddish brown, often covered with moss Fruit: Yellow with dark red vertical lines	Large yellow flower (5 petals) Stamen style are pink Large pink buds



Dipterocarpus validus

Family: Dipterocarpaceae
Malay: Keruing kasugoi

LEAVES	FRUIT
Simple, large, long, alternate, strongly pinnate, wavy Hair: none	Brown, two-winged fruit
BARK	FLOWER
Beige brown Fruit: yellow pink	

Garcinia parvifolia

Family: Clusiaceae
Malay: Kandis

LEAVES	Opposite, entire, elliptical, 7-15 cm x 4-6 cm, yellow / red
BARK	Dark brown, rough
FRUITS	Big yellow green balls (like apples), 5 seeds / fruit
FLOWERS	Small yellow



Dracontomelon dao

Family: Anacardiaceae
Malay: Sengkuang

Large tree (> 40 m). Large buttress (roots).

LEAVES	Compound (long elliptical leaflets), 1-2 m long, 10-15 cm wide, clustered at the end of the twig
BARK	Smooth with some irregular 'kales' peeling off, faint pink, sweet
FRUITS	Small balls (5 chambers), 1-2 cm
FLOWERS	Tiny white flowers, arranged in long panicles



Kleinhovia hospita

Family: Malvaceae
Malay: Timahar

LEAVES	Cordate, simple, alternate, long petiole
BARK	Beige, peeling off, faint pink, orange
FRUITS	Small, star shape, green, 1-2 cm
FLOWERS	Tiny pink flowers



Ficus racemosa

Family: Moraceae
Malay: Tangkol

Very common along riverbanks

LEAVES	Simple, elliptical, entire, 10-15 cm long, 5-10 cm wide, veins highly visible
BARK	White, beige, grey, faint pink with white endoste
FRUITS	Small, round, green, 1-2 cm
FLOWERS	Inside the fig



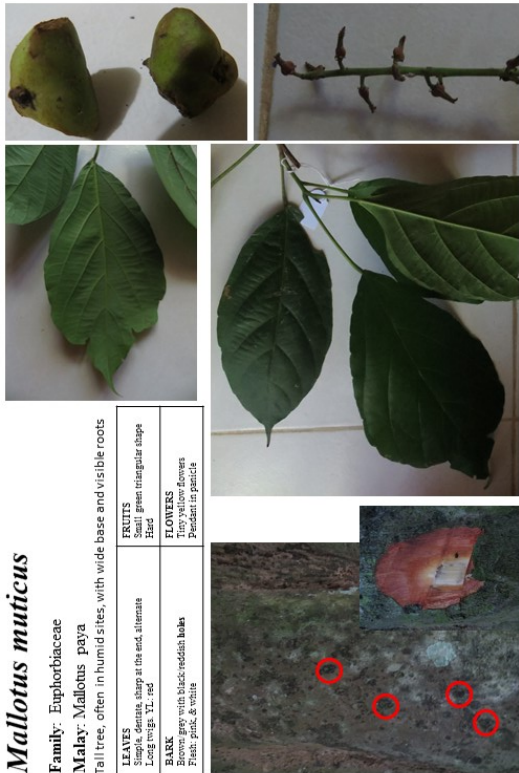
Mallotus muticus

Family: Euphorbiaceae

Malay: Mallotus paya

Tall tree, often in humid sites, with wide base and visible roots

LEAVES	FRUITS
Simple, dentate, sharp at the end, alternate	Small green triangular shape
Long veins, TL red	Hard
BARK	FLOWERS
Grey, peeling off with black reddish buds	Small green
Fruit: pink & white	Pendant in panicle



Memecylon borneense

Family: Melastomataceae

Malay: Nipis kulit

LEAVES	FRUITS
Simple, small, opposite, elliptical, thick, entire margin. Venation is not visible	Small green balls
BARK	
Brown, peeling off	
Fruit: beige, orange	



Lagerstroemia speciosa

Family: Lythraceae

Malay: Bungur

LEAVES	FRUITS
Simple, opposite, glossy green, waxy	Round woody capsule, splitting in 5 places when mature
Young leaves: red	
BARK	FLOWERS
Smooth, beige	Large purple flowers in upright panicles
Fruit: pale pink and purple	

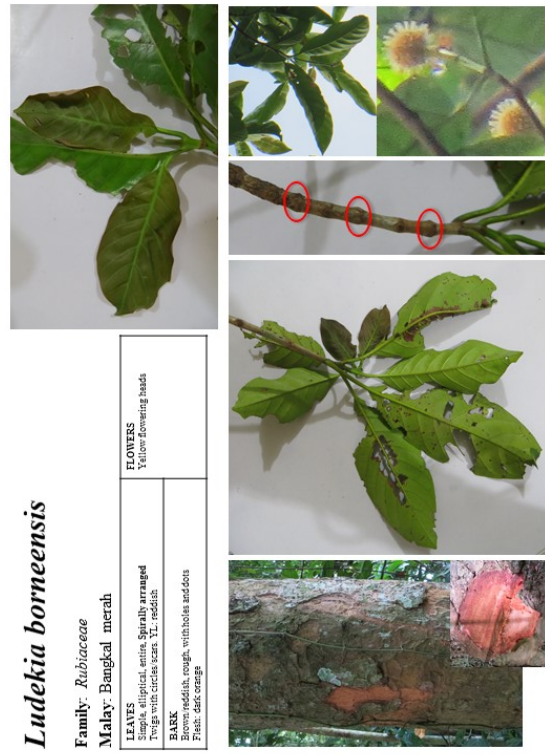


Ludokia borneensis

Family: Rubiaceae

Malay: Bangkal merah

LEAVES	FRUITS
Simple, elliptical, entire, spirally arranged	Yellow flowering heads
BARK	
Bark: reddish, rough, with holes and dots	
Fruit: dark orange	



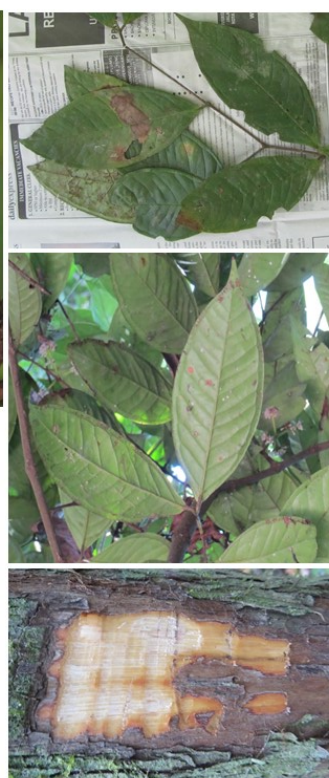


Memecylon paniculatum

Family: Melastomataceae

Malay: Nipis kulit

LEAVES	FLOWERS
Simple, opposite, elliptical, pinnate, sharp at the end	Tiny in panicles
Characteristic: second border before the margin	White, purple
BARK	
Dark brown, peeling off. Twigs are reddish.	
Fls. yellow-orange	

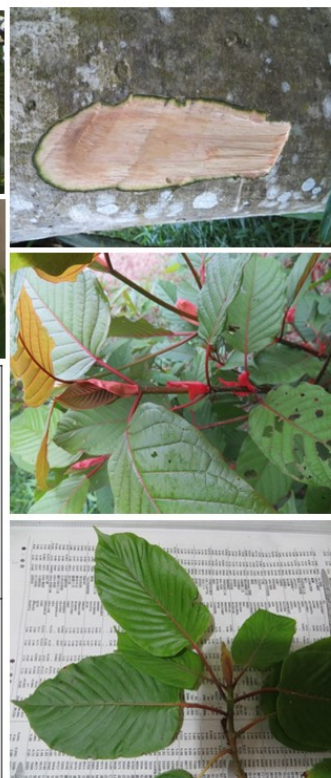


Mirtagyna speciosa

Family: Rubiaceae

Malay: Sepat

LEAVES	FRUIT
Simple, opposite, elliptical, venation highly visible, stipules with a central keel. Long reddish stem.	Globose fruiting head, winged seeds
BARK	FLOWERS
Bright pale grey, smooth	Yellow flowering buds
Fls. pale pink with green border	

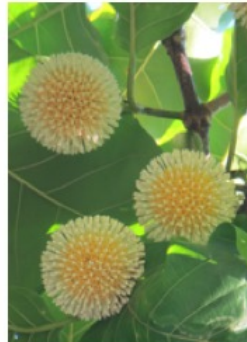


Nauclea orientalis

Family: Rubiaceae

Malay: Bangkal

LEAVES	FRUIT
Simple, opposite, oblong-ovate	Globose fruiting head, brown
Large stipules	Tiny seeds (2mm)
BARK	FLOWERS
Brown rough	White and yellow flowering buds, at the end of branches



Nauclea subdita

Family: Rubiaceae

Malay: Bangkal icecream

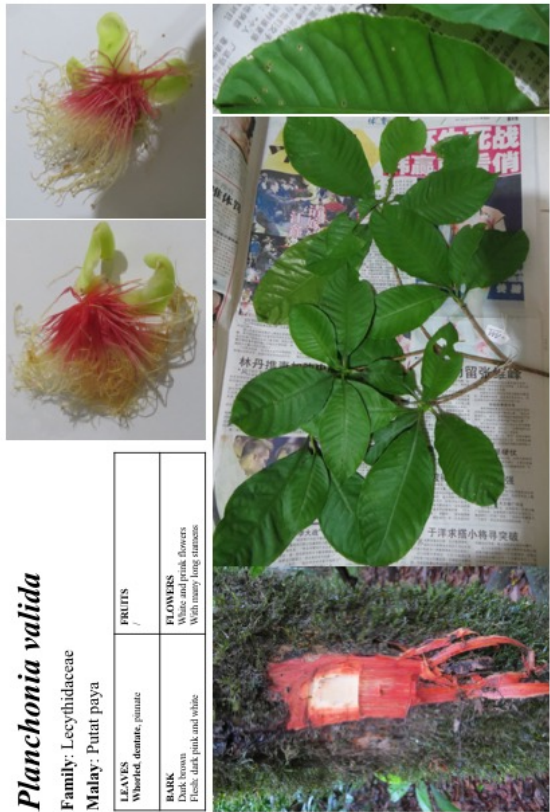
LEAVES	FRUIT
Simple, opposite, oblong-ovate, pinnate	Globose fruiting head, brown
BARK	FLOWERS
Brown orange-brown	White and yellow flowering buds, at the end of branches
Fls. orange with purple red lines	



Planchonia valida

Family: Lecythidaceae
Malay: Putat paya

LEAVES	FRUITS
Whorled, dentate, pinnate	
BARK	FLOWERS
Dark brown Flesh: dark pink and white	White and pink flowers With many long stamens



Neolamarckia cadamba

Family: Rubiaceae
Malay: Laran

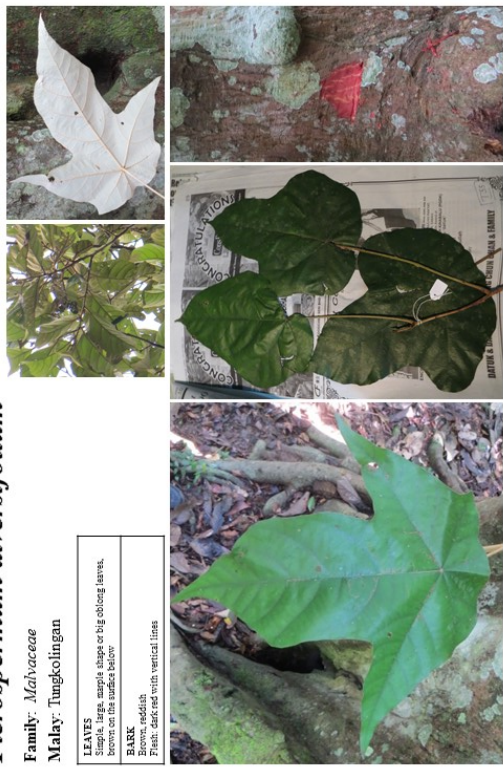
LEAVES	FRUITS
Opposite, rounded to heart-shaped bases, pinnate glossy, Large stipules	Globose filling bead Tiny seeds (2mm)
BARK	FLOWERS
Trunk is straight, brown with vertical lines (fissured) or pimples Flesh: yellow/orange, Seed: sweet apple	White and yellow, flavescing heads, at the end of branches



Pterospermum diversifolium

Family: Malvaceae
Malay: Tungkolingan

LEAVES	BARK
Simple, large, sample shape or big oblong leaves, brown on the surface below	Brown, reddish Flesh: dark red with vertical lines

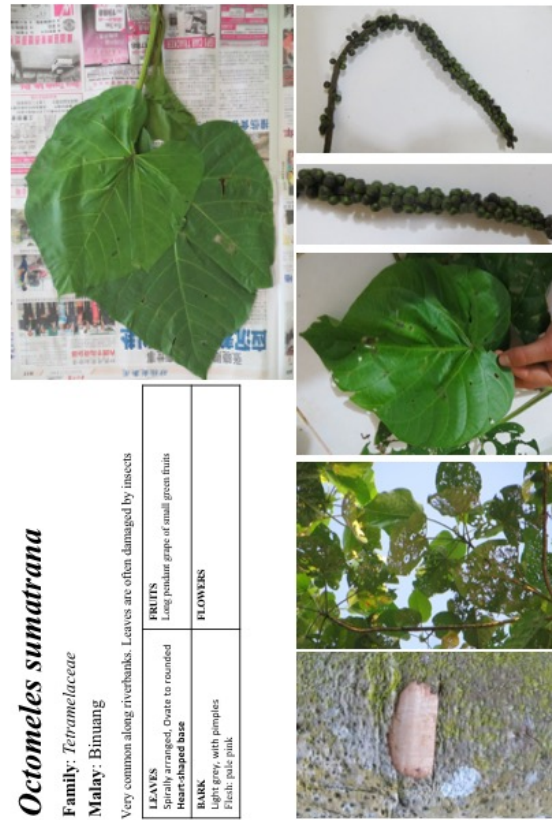


Octomeles sumatrana

Family: Ternstroemiaceae
Malay: Binuang

Very common along riverbanks. Leaves are often damaged by insects

LEAVES	FRUITS
Spindle arranged, ovate to rounded Heart-shaped base	Long pendular grape of small green fruits
BARK	FLOWERS
Light grey, with pimples Flesh: pale pink	



Vitex pinnata

Family: Lamiaceae

Malay: Kulimpapa

LEAVES	FRUITS
Pinnately compound (5 leaflets, with the outer 2 often smaller) <i>Recreational vegetation</i>	Small drupes Green, ripening purple or dark
BARK	FLOWERS
Dark brownish grey Flesh orange-yellow	Terminal panicles White; later petals

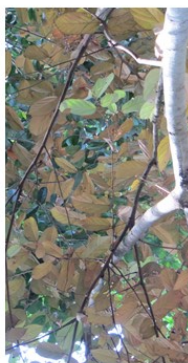


Pterospermum elongatum

Family: Malvaceae

Malay: Bayur

LEAVES	FRUITS
Simple, alternate, oblong, entire margin Brown on the surface below	Big long brown capsule
BARK	FLOWERS
Very characteristic: velvety with dark marks. First: red with vertical lines	Yellow, long

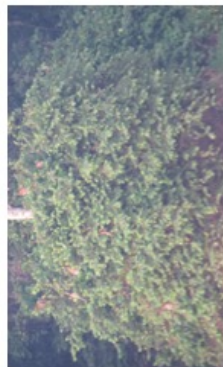


Bridelia stipularis

Family: Phyllanthaceae

Malay: Sin-da-darum

LEAVES	FRUITS
Alternate, soft, hairy, pinnate <i>Sagale on logs</i>	Small green balls
BARK	FLOWERS
Dark brown, cracking Flesh: pink, and white	/



Rauvolfia sumatrana

Family: Apocynaceae

LEAVES	FRUITS
Simple, rounded (3), very close secondary veins	White balls in panicles
BARK	NO EXUDATE (cf. Alseodaphne sp.)
Rough brown; yellowish Orange flesh. Mango smell.	





Cayratia trifolia

Family: Vitaceae

LEAVES	FRUIT
Simple, small, dentate Trifoliate (per 3)	Small berries green => red => black In panicle shape
BARK	FLOWERS
With reddish twigs	/



Lophopyxis maingayi

Family: Lophopyxidaceae

LEAVES	FRUIT
Simple, dentate, alternate, arcuate and highly visible veins	/
BARK	FLOWERS
Whitish, milky latex Fruit: pale pink	/



Uvaria littoralis

Family: Annonaceae

LEAVES	FRUIT
Large, alternate, elliptical, pinnate, entire, Large veins	Small yellow balls in panicles
BARK	FLOWERS
/	/



