Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Evolutiva

Evolução Morfológica no Crânio de
Lemuriformes
(Primates: Strepsirrhini)

Lemuriformes (Primates: Strepsirrhini) Canial morphologic evolution

5

Anna Penna

17 de maio de 2016

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Evolutiva

Evolução Morfológica no Crânio de
Lemuriformes
(Primates: Strepsirrhini)

5

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia Evolutiva. Orientador: Gabriel Marroig

Anna Paula Casselli Penna

2016

Ficha Catalográfica

Penna, Anna Paula Casselli

Evolução Morfológica no Crânio de Lemuriformes (Primates: Strepsirrhini)

110 páginas

Dissertação de Mestrado

Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Genética quantitativa comparativa
2. Estabilidade de G
3. Matriz P
4. Deriva Genética

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

5

Prof. Dr.
GABRIEL MARROIG
ORIENTADOR

*Aos mestres que
não me amestraram.*

Agradecimentos

Cada parágrafo dessa dissertação está aninhado em etapas de aprendizado intensas que vão além de sua forma material. Foi com o tempo e com o apoio de muitos envolvidos que amadureci meus últimos 3–4 anos nisso que você tem em mãos agora.

5 Meu maior agradecimento vai a todos gestos de ensinamento oferecidos à minha formação ao longo desse processo. Muito obrigada pela atenção, preocupação e manifestações infinitas de gentileza que todos vocês, cada qual a sua maneira personagem essencial à conclusão desse trabalho, dedicaram a mim com tanto carinho. No (wo)men is an island, não se faz ciência sozinha e vocês sabem que eu não sei nem comer sem companhia.

10 Gabriel, obrigada por me incluir ao LEM. É uma honra trilhar os caminhos da ciência nesta equipe de altíssimo nível que você reuniu. Acima de tudo, obrigada pela confiança ao me incubir a tarefa de iniciar o que eu chamaria de *Opus III da ópera da integração morfológica dos primatas*. Meus colegas de LEM, eu não teria adentrado nessa jornada se não tivesse a companhia e parceria de vocês. MUITÍSSIMO obrigada por me acolherem e por me permitirem aprender com seus trabalhos e esforços
15 diários. Não tem mais como arrancar a genética quantitativa da minha interpretação do mundo. Cada um de vocês adicionou um tanto de variação à minha perspectiva que me faz mais apta a responder a direções e pressões de seleção que antes não seria capaz. Alex, sua calma é uma inspiração; Aninha, sempre pelo apoio molecular e marmiteiro; Daninha, valeu por espalhar sua serenidade; Tafs, por todos os resgates ao longo dessa trajetória; Paulinha, pela paciência ao me explicar as coisas um milhão
20 de vezes; Lugar, você ocupa um lugar especial no meu <3; Wally, meu irmão de mestrado, obrigada por me deixar desesperada e depois falar que vai dar tudo certo; Ed-Ghar, por me lembrar que está chovendo lá fora; My Angel, muitíssimo obrigada pela sua honestidade e por sempre exigir o melhor de mim com as suas provocações; Oger, meu amigo sempre presente você me dá uma força tremenda pra concretizar minhas capacidades; Pato Mestre Garcia, obrigada pelos exercícios diários de percep-
25 ção e construção dos significados da realidade: *this is water!* Astral, espero conseguir te proporcionar tantas coisas boas quanto eu recebi dessa galera. A todas as mulheres que me cercaram na vivência do ambiente acadêmico, obrigada por me lembrarem cotidianamente da importância do famoso slogan feminista *Sisterhood is powerful*, em especial a Maria D. Vibranovski que me ajudou muito a olhar pra frente ao longo desse último semestre.

30 Não se mede crânios de lêmures sem Lêmures que saltavam soltos por Madagascar há centenas de anos. Espero poder honrar a morte destes animais incríveis revelando um pouco mais sobre sua história evolutiva. Aproveito para agradecer os esforços de F.P.L. Pollen, D.C. Van Dam, J. Audebert e R. Archbold, coletores responsáveis por mais de metade dessa amostra; e às coleções museológicas que os abrigam: AMNH, FMNH, USNM, MCZ, DFP, RMNH, AZM, MNHN, RBINS e ZMB. Também não se
35 viaja mais de 10 mil Km ao redor do mundo medindo crânio de lêmures sem dinheiro. Agradeço às

agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq. Aproveito para fazer um apelo para que valorizem mais o mestrado na formação dos cientistas brasileiros. Aprendizado requer prática e amadurecimento. Essa oportunidade foi crucial para minha trajetória profissional.

A coleta de dados também me permitiu colecionar amigos ao redor do mundo. Pessoas incríveis que me receberam como família e tornaram minha vida cigana uma experiência mais valiosa e menos dolorosa. Agradecimentos especiais aos queridos Eileen Westwig, Bruce Patterson, Gregg Gunnel, Pepijn Kamminga, Becky Desjardins e Steffen Bock por me abrirem portas até as entranhas das coleções e me apresentarem a um mundo de respeito e cuidado com o material tão valioso que abrigam. Também pude entrar em contato com pesquisadores de outras instituições como Sebastien Couette, que me acolheu durante a BEPE na Europa, James Herrera, meu primeiro lemur-friend, Sílvia Pavan, que me ensinou a olhar com cuidado os crânios antes mesmo dessa idéia ser um projeto oficial, Lauren Gonzales, David Santana, Pedro Peloso e Ronald de Ruiter. Agradeço também a paciência e coração enorme daqueles que são minhas fontes inesgotáveis de sorrisos Caquiz, Paula, Thaizinha e Amarula, minha Lêmure ilustradora oficial.

Minha família, além de todo apoio moral e financeiro, obrigada principalmente por terem me criado aberta para apreciar a beleza da biologia. Meus avós, obrigada por me receber em jantares inesperados e pela atmosfera de infância em meio a rotina paulistana maluca. Mamis, sempre meu porto seguro, você construiu um barquinho bem forte que vem navegando por mares bravos; Papiúsculo, obrigada por me colocar pra brincar com o *Origins* do Leakey e Lewin desde pequenininha; Tati, minha pulga d'água que arrebenta nas ciências, agora somos oficialmente a primeira geração de acadêmicas da família! Krika, obrigada por todo o acolhimento e ajuda, você faz muita falta no meu dia-a-dia. Ivan Prates, meu parceiro (e)terno nessa jornada intensa que a gente chama de vida, obrigada por admirar minha fúria, por respeitar o meu ser mamífero e por sempre me motivar a aproveitar ao máximo minha passagem nesse planeta. Com você eu sinto que minha vida se multiplicou e que posso ir a todos os lugares.

O meio acadêmico nos obriga a enfrentar abstrações ultra intelectualizadas o tempo todo. Andrea Wellbaum, com a dedicação da sua equipe numa sala a 40°C desenvolvi uma sincronia com meu corpo que me faz sentir mais consciente nas minhas ações. Por último, Dona morte, obrigada por sempre me lembrar que viver é uma vez só e que quando acaba: acaba.

Resumo

O principal objetivo deste estudo foi investigar os processos responsáveis pela evolução morfológica craniana de primatas da subordem Strepsirrhini, com maior ênfase ao clado endêmico à ilha de Madagascar. Sistemas multidimensionais morfológicos como o crânio descrevem a quantidade de variação disponível para atuação de processos evolutivos. A partir de 27 marcos anatômicos cranianos e 39 distâncias euclidianas estimei matrizes de variância e covariância fenotípicas (**Matrizes P**) para 40 espécies das sete famílias viventes de Strepsirrhini e duas espécies do gênero *Tarsius*. Utilizei a abordagem da genética quantitativa para investigar o padrão de variação nas matrizes **P** dessa linhagem de primatas, conjuntamente com um par de matrizes fenotípica e genética de *Saguinus fuscicollis*. Para investigar a estabilidade e conservação do padrão da estrutura de variação ao longo da diversidade deste clado de primatas comparei estas matrizes através de dois métodos complementares que me permitiram avaliar a distribuição da variação no morfoespaço (Random Skewers) e o compartilhamento de direções de variação (Krzanowski) das matrizes. Os resultados obtidos sugerem uma estabilidade das matrizes, possivelmente mantida por seleção estabilizadora interna comum ao clado, aos demais primatas e mamíferos em geral. Esses resultados de comparação de matrizes são apresentados no **Capítulo 1** e corroboram a conjectura de Cheverud, indicando que as matrizes cumprem o pressuposto de similaridade estrutural entre as matrizes **P** e a matriz $\tilde{G}$. Além disso o padrão de variação apresentou um sinal filogenético e algumas das diferenças observadas nas matrizes parecem estar relacionadas com fatores de dieta. No **Capítulo 2** investiguei a evolução da divergência morfológica craniana em um conjunto de 70 espécies, onde testei a hipótese nula de deriva genética como explicação suficiente para a divergência entre as médias das espécies. Esta hipótese foi avaliada dentro das expectativas de modelos da genética quantitativa através de duas metodologias. Tais testes avaliam a proporcionalidade de variação dentro (**W**) e entre grupos (**B**) sob perspectivas complementares. Com o teste de regressão investiguei a manutenção da quantidade de variação associada a cada eixo de variação, e com o teste de correlação avaliei o alinhamento entre estes eixos. Rejeitamos a H_0 em diversos pontos da árvore que representam eventos de cladogenese a nível de família e gênero. Nestes casos aceitamos a H_1 de seleção natural e vemos que a maior parte da diversificação da linhagem de primatas de Madagascar foi influenciada por seleção direcional envolvendo tamanho e alterações anatômicas relacionadas a dieta.

Palavras-chave: Strepsirrhini, primatas, matriz P, deriva genética.

Abstract

The main goal of this study was to investigate the evolutionary processes responsible for Strepsirrhini cranial morphological evolution. Multidimensional morphological structures like the cranium can describe the amount of variance available to evolution. We used 27 landmarks and 39 euclidean distances between them to describe the variation in the cranium. We used a broad phylogenetic scaled comparison of cranial **P** matrices representing 40 species of Strepsirrhini primates combined to a pair of *Saguinus fuscicollis* **G** and **P** to investigate the stability of variance structure along this lineage. Our results show a relative stability in the patterns of variance and covariance of the clade and that **P** matrices can be considered as surrogates to its underling **G**. We also report a high association between matrix similarity and phylogenetic distance. We investigated particular contributions of each trait to matrix dissimilarity through a evolutionary perspective considering the main dietary shifts observed in the clade. Our results suggest that differences in observed patterns of variation can be attributed to characters with heterogeneity in the degree of stabilizing selection in the adult cranium and to differences in directional selection involved in chewing of specialized feeding behavior. Under the quantitative genetics theory lies an expectation for the evolution of average phenotypes that if populations have diverged by random processes, patterns of within and between-taxon morphological variation should be proportional. In chapter 2 we tested the null hypothesis that genetic drift is a sufficient explanation to observed divergence in cranial multivariate means of 70 Strepsirrhini primates. We detected deviations from neutrality along the whole clade of Strepsirrhini and specially in more inclusive nodes. We argue that this deviations reflect important historical shifts in the evolution of the clade associated with directional selection for size and in anatomical features related with diet.

Keywords: word1, word2, word3

Sumário

	1	Introdução Geral	1
		1.1 Strepsirrhini	1
		1.1.1 Breve revisão sistemática	1
5		1.1.2 Radiação do clado e Colonização de Madagascar	3
		1.1.3 Diversidade de Primatas de Madagascar	5
		1.1.4 Madagascar: Estrutura climática	9
		1.1.5 Lêmures: Uma radiação adaptativa?	11
		1.2 Embasamento teórico	12
10		1.2.1 Breve histórico do estudo de evolução fenotípica	14
		1.2.2 Genética quantitativa	15
		1.2.3 A estabilidade de G ao longo do tempo	20
		1.2.4 Crânio de mamíferos como um modelo para estudar evolução	22
		1.2.5 Integração e Modularidade	22
15		1.2.6 Morfologia de Lemuriformes	24
		1.2.7 A morfologia craniana de lêmures no contexto da ordem Primates	25
		1.3 Objetivos, Perguntas e Hipóteses	27
		1.4 Metodologia	29
		1.4.1 Identificação	29
20		1.4.2 Filogenia	31
		1.4.3 Coleta de dados	33
		1.4.4 Estimativa de Matrizes de V/CV	36
		1.4.5 Comparação de matrizes: estrutura e padrão de V/CV	38
		1.4.6 Comparação de matrizes: estatísticas evolutivas	40
25		1.4.7 Efeito de processos evolutivos	41
	2	Chapter I	43
		2.1 Introduction	43
		2.2 Methods	44
		2.3 Results	48
30		2.4 Discussion	54
		2.5 Conclusions	59
	3	Chapter II	60
		3.1 Introduction	60
		3.2 Methods	61
35		3.3 Results	65
		3.4 Discussion	73
	4	Conclusões e Perspectivas futuras	77
	5	Apendice	80
		5.1 Chapter I	80
40		5.2 ChapterII	86
		Bibliography	89
		5.3 Specimen list	100

Lista de Figuras

1.1	Paleo-reconstrução: Isolamento da ilha de Madagascar	4	
1.2	Mapa com a distribuição e radiação de Strepsirrhiniis viventes	4	
1.3	Zonas climáticas e Biogeográficas de Madagascar	10	
1.4	Restrições impostas por G à adaptação	19	5
1.5	Morfoespaço Craniano da Ordem Primates	26	
1.6	Filogenia Primatas viventes e extintos segundo Herrera e Davalos 2015	32	
1.7	Posicionamento das <i>Landmarks</i> no crânio	34	
2.1	Summary of all species V/CV matrices comparisons and corrections applied	49	
2.2	Rarefaction analysis in <i>Microcebus griseorufus</i> matrix, and ranges of matrices similarity	50	10
2.3	First 4 PCs' proportion of variance calculated per species	50	
2.4	Mean matrix evolutionary statistics by specie	51	
2.5	Pooled within matrices similarity	52	
2.6	SRD results in wireframes per node	53	
2.7	SRD comparison per diet category represented in wireframes	54	15
3.1	Scheme of drift tests as proposed by (Ackermann and Cheverud, 2000)	65	
3.2	Summary of drift tests results displayed at phylogeny	66	
3.3	Regression test results for the 13 main nodes of the Strepsirrhini phylogeny	67	
3.4	B, W and W fixed PC 1-10 proportion of variance for the main nodes of the Strepsirrhini phylogeny	68	20
3.5	Ratio between trace of B and trace of W in all tested nodes	70	
3.6	Correlation test results for the 13 main nodes of the Strepsirrhini phylogeny	71	
3.7	Traits loadings on W PC 1 to 4 represented in wireframe	72	
3.8	Biplot of species means projected in PC1 x PC4 of Strepsirrhini Ancestral W matrix	72	
4.1	Biplot PC1 x PC4 da diversidade de Strepsirrhini fósseis e viventes	79	25
5.1	Traits coefficient of variance and repeatabilities following Lessells and Boag (1987)	80	
5.2	<i>Microcebus griseorufus</i> estimated matrices comparison	81	
5.3	Species's V/CV matrices raw values of comparisons via Random Skewers and Krzanowski methods	83	
5.4	Species's V/CV matrices raw values of comparisons via RS and KRZ methods corrected by Monte Carlo repeatability	84	30
5.5	Species's V/CV matrices comparisons via RS and KRZ corrected by sample size	85	
5.6	PC 1 – 4 correlation with Isometric Vector	86	
5.7	B, W and W fixed PC 1-10 proportion of variance for the main nodes of the Strepsirrhini phylogeny	87	35

Lista de Tabelas

1.1	Descrição dos marcos anatômicos no crânio	34	
1.2	Hipóteses Modulares: função e desenvolvimento	35	
2.1	Summary of comparison between Strepsirrhini species P and <i>Saguinus fuscicollis</i> G and P	51	
2.2	SRD general mean scores per diet category	53	40
3.1	Summary of regression test drift with and without PC1	69	
4.1	Amostra de subfósseis de Madagascar	79	
5.1	P-values for multivariate models for sex effect on euclidean distances	81	
5.2	Matrix repeatability, detailed sample size by sex and mean values of comparison via RS and KRZ methods	82	45
5.3	Strepsirrhini ancestral matrix first 10 PC	88	

O formato da dissertação

Este documento foi organizado em introdução e conclusão gerais em português e dois capítulos em inglês preparados na forma de manuscrito de artigo científico. Acreditamos que essa escolha valoriza os esforços dedicados à dissertação por otimizar as etapas necessárias para divulgar o conhecimento gerado ao longo dos últimos três anos. As rotinas desenvolvidas pela equipe do Laboratório de Evolução de Mamíferos (LEM) podem ser encontradas no material referente ao pacote [evolgg](#) (Melo et al., 2015) no CRAN. Rotinas mais específicas a esta dissertação estão disponíveis para acesso público em minha conta [VareciaRubra](#) no GitHub¹.

Na introdução geral apresento o leitor ao sistema investigado levantando algumas das questões re-
levantes que fazem dos primatas Strepsirrhini um grupo interessante para estudos evolutivos. Nessa
sessão contextualizo o estudo de evolução morfológica e exponho detalhes dos fundamentos teórico-
metodológicos deste projeto. Em seguida, exponho as perguntas fundamentais do projeto e a abordagem
adotada para respondê-las. O [Capítulo 1](#) é dedicado à comparação de matrizes fenotípicas
estimadas para espécies de primatas Strepsirrhini e do gênero *Tarsius* em conjunto com um par de
matrizes fenotípica e genética de *Saguinus fuscicollis* estimadas por [Cheverud \(1996b\)](#). Porque com-
parar matrizes? A estabilidade de matrizes G ao longo do tempo evolutivo ainda é foco de extensos
debates na biologia evolutiva. Esta dissertação contribui para melhor compreendermos esta lacuna
do conhecimento. Além disso, verificar o padrão estrutural de matrizes deve ser o primeiro passo para
a aplicação dos modelos de genética quantitativa aos estudos de evolução morfológica. Através destas
comparações verifiquei a adequabilidade das matrizes ao pressuposto de semelhança estrutural entre
as matrizes fenotípicas e uma matriz genética média. Esse pressuposto é fundamental para a aplicação
dos modelos de genética quantitativa empregados no [Capítulo 2](#). Nele entro mais a fundo no estudo
da biologia evolutiva dos primatas de Madagascar ao testar a hipótese nula de que deriva genética foi
o principal processo evolutivo atuando na divergência morfológica dessa linhagem. Encerro em uma
conclusão geral com comentários acerca das análises complementares para explorar os resultados ob-
tidos neste estudo.

¹<https://github.com/VareciaRubra/MScMadagascar>

1 Introdução Geral

1.1 Strepsirrhini

A ordem dos primatas (Primates) é formada pelas subordens Strepsirrhini e Haplorrhini (onde, além dos Tarsius, encontram-se os Catarrhini e Platyrrhini, comumente denominados macacos do velho e do novo mundo respectivamente). O clado dos Strepsirrhini (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1812) tem sua monofilia sustentada por análises moleculares (Goodman et al., 2005; Karanth et al., 2005; Roos et al., 2004; Williams et al., 2010; Xing et al., 2007) e caracteres morfológicos peculiares (Schwartz and Tattersall, 1985, 1987; Szalay and Katz, 1973; Szalay et al., 1987; Tattersall and Schwartz, 1991).

Quanto a morfologia, o clado pode ser rapidamente reconhecido pelo arranjo singular dos incisivos e caninos inferiores (com a exceção de Daubentoniidae): estreitos, alongados e justapostos formando um pente inclinado (*tooth comb*). Esse arranjo da dentição é utilizado na manutenção da pelagem e na alimentação (Masters et al., 2006), enquanto os pré-molares anteriores da mandíbula apresentam um aspecto caniniforme e atuam como caninos cooptados (Masters et al., 2006). O primeiro par de incisivos superiores apresenta um diástema mediano. Esse espaço aloja os receptores vomeronasais bem desenvolvidos, que atuam na detecção de feromônios (Asher, 1998). Apesar de apresentarem a barra pós orbital completamente formada, os primatas deste clado são facilmente reconhecidos pela ausência de septo separando a fossa orbital da fossa temporal. Além disso, apresentam uma garra no segundo dígito dos membros posteriores (*grooming claw, em inglês*), e uma sub-língua anexa à porção proximal da superfície inferior da língua, uma estrutura cartilaginosa, achatada e de margens dentadas utilizada na limpeza dos incisivos inferiores (Pocock, 1918).

Quanto a diversidade de hábitos e especializações locomotoras, existem saltadores habilidosos (*Galago*), escaladores lerdos (*Loris*) e até mesmo alguns capazes de se deslocar por grandes distâncias usando apenas os membros inferiores (*Propithecus*). Quanto aos hábitos de vida, a grande maioria é ativa exclusivamente durante a noite, mas existem grupos catemerais ativos durante o dia e a noite (*Eulemur*) ou exclusivamente diurnos (*Indri*). Sua dieta é bastante variada, sendo compostas por frutas, flores e insetos em proporções variadas mas alguns representantes se alimentam exclusivamente de folhas tóxicas de bambú (*Hapalemur*).

1.1.1 Breve revisão sistemática

Atualmente são reconhecidas 7 famílias viventes no clado dos Strepsirrhini, representando mais de um terço da diversidade de espécies da ordem Primates. As famílias são classificadas em duas radiações de grupos geográficos definidos, que atualmente apresentam uma distribuição disjunta (Figura 1.2 Masters et al., 2006). Os representantes desse clado são encontrados na região tropical e subtropical do continente africano, na ilha de Madagascar e no sudoeste asiático, incluindo porções continentais e

insulares.

A infraordem Lorisiformes é a radiação Afro-Asiática dos Strepsirrhini, com duas famílias menos diversas tanto em relação ao número de espécies quanto a aspectos ecológicos. Em diversos trabalhos argumenta-se que a divergência entre as duas famílias de Lorisiformes (Galagidae e Lorisidae) se deu por duas radiações marcadas por diferenças nas estratégias de forrageamento (Nekaris and Bearder, 2007) que podem ser relacionadas a aspectos evolutivos sociais, fisiológicos, e anatômicos (Rasmussen et al., 1998). Os Lorisidae (lorises e potos), família encontrada na porção tropical do continente africano e no sudoeste asiático, são notórios pela lenta movimentação escalatória. Os Galagidae (gálagos), por outro lado, se deslocam com grande agilidade saltatória nas copas das árvores em florestas da África sub-saariana. Todos os membros desse clado apresentam menos de 2 kg, são exclusivamente noturnos e alimentam-se de insetos, frutos, flores e seiva.

Endêmicas de Madagascar, as infraordens² Lemuriformes e Chiromyiformes abrigam cinco famílias viventes com ampla variedade de hábitos locomotores, dietas e organização social: Cheirogaleidae, Lemuridae, Indridae, Lepilemuridae e Daubentoniidae. Além dessas famílias, são reconhecidas três outras de representantes gigantes recentemente extintos de subfósseis lêmures: Palaeopropithecidae (semelhantes a preguiças gigantes), Megaladapidae ("lêmures coalas") e Archaeolemuridae ("lêmures macacos"). Os registros de subfósseis lêmures foram encontrados em depósitos cársticos datados entre 26 e um mil anos (Godfrey and Jungers, 2003; Goodman and Jungers, 2014; Yoder, 2012). Mais detalhes podem ser encontrados na Subsubseção 1.1.3.

Antigamente os tarsios (Tarsiidae: Primates) eram agrupados com os demais Strepsirrhini, seguindo a hipótese dos *prosimians* (Schwartz and Tattersall, 1987). Seu posicionamento na filogenia dos primatas esteve cercado por incertezas durante décadas, principalmente devido a vieses relacionados às análises filogenéticas baseadas exclusivamente em genes mitocondriais (revisão detalhada em Hartig et al., 2013; Yoder, 2003). Entretanto, com o avanço das técnicas moleculares e acúmulo de esforços de seqüenciamento de genes nucleares foi possível estabilizar seu posicionamento como grupo irmão dos macacos antropóides logo nos primórdios da diversificação do clado dos Haplorrhini (Horvath et al., 2011; Jameson et al., 2011; Yoder, 2003).

Os lêmures e demais Strepsirrhini fizeram parte das publicações das principais técnicas moleculares desenvolvidas desde a década de 1950 e estiveram no foco de estudos utilizando tais técnicas desde a emergência do campo (Yoder, 2012). A topologia das árvores se manteve relativamente estável (mais detalhes consultar a revisão por Yoder (2012)). Desde os primeiros estudos a partir de análises de imunodifusão para medir distâncias genéticas realizados no final da década de 70 e começo da seguinte (Dene et al., 1980, 1976), até com análises de evidência total (Herrera and Davalos, 2016).

²Ao longo da dissertação o termo "lêmure" será adotado para se referir aos representantes extintos e viventes dessas duas infraordens.

1.1.2 Radiação do clado e Colonização de Madagascar

Na extensa literatura primatológica é bastante aceita a teoria de que a radiação dos Strepsirrhini teve seu início no continente africano (Masters et al., 2006; Seiffert, 2007; Seiffert et al., 2003; Yoder, 1997; Yoder et al., 1996a), de onde uma radiação de Lorises teria migrado para a porção asiática do globo e os Lêmures teriam colonizado Madagascar (Tattersall, 2006). Alguns autores propõe que o evento de dispersão de lêmures para a ilha ocorreu no início do Paleozóico, entre 55 e 60 Ma (Poux et al., 2005; Roos et al., 2004), um evento próximo à origem do clado dos primatas. Estimativas paleontológicas por registros fósseis datam de 63-65 Ma (Fleagle, 1999), sendo que o registro mais antigo do primeiro "primata verdadeiro" data de aproximadamente 56 Ma (Beard, 2008). Enquanto isso, datações por divergências moleculares chegam a estimativas ainda mais antigas para a origem da linhagem dos primatas, entre 60 e 80 Ma (Horvath et al., 2011).

A colonização da ilha teria ocorrido pela radiação do ancestral lêmure entre 58–73 Ma (Yoder and Yang, 2004) (dados moleculares) e 49–61 Ma (Herrera and Davalos, 2016) (molecular combinado com morfologia). A discrepância entre datações moleculares e registros fósseis pode ser em parte atribuída a limitações das técnicas de calibração molecular para maximizar a informação advinda de fósseis, uma vez que fósseis não são um registro exato do tempo de emergência de determinado clado (Herrera and Davalos, 2016). Também parece haver desaceleramento convergente em taxas de evolução molecular (Steiper and Seiffert, 2012). De qualquer forma, a monofilia do grupo dos lêmures e aye-aye proposta por Dene et al. (1976) é consistentemente recuperada. Essa linhagem parece ter divergido nos primórdios da radiação de primatas e logo cruzado o canal de Moçambique, colonizando a ilha em um único evento bem sucedido (Masters et al., 2006).

A separação da porção do atual continente africano e Madagascar se iniciou bem antes de qualquer colonização por mamíferos, logo após o começo da disjunção das porções norte (Laurasia) e sul (Gondwana) da Pangea, há cerca de 160-155 Ma, sendo que a ilha teria ocupado sua posição atual no Oceano Índico há cerca de 130-118 Ma (Yoder, 1997), onde encontra-se 430 km distante da costa da África e 4.000 km da Índia (Figura 1.1.2). Dessa forma, a colonização envolveu uma viagem de cerca de 500 km cruzando o canal de Moçambique a bordo de "jangadas naturais" flutuantes, como o modelo de páreo (*sweepstake route*) proposto por Simpson (1940). Nesse modelo de dispersão a distância e as condições ecológicas nas regiões intermediárias seriam restritivas, contribuindo para uma diminuição na chance de cruzar a barreira.

Figura 1.1 – Representação da quebra da Pangea e subsequente isolamento de Madagascar e deslocamento da Índia, baseado em Yoder and Nowak (2006). **a.)** Gondwana como supercontinente contínuo contendo as superfícies de terra que atualmente compreendem a África, América do Sul, Antártica, Austrália, Índia e Madagascar. **b.)** Pouco após a separação entre a Laurásia (contendo a América do Norte) e Gondwana houve um rifte entre a porção oeste da Gondwana (África e América do Sul) e a porção leste (Madagascar, Índia, Antártica e Austrália), a partir deste ponto Madagascar e o restante da porção leste da Gondwana começa a se afastar a sudoeste em relação ao continente africano, sendo que o completo isolamento entre eles se deu há pelo menos 118 Ma. **c.)** Começo da formação do subcontinente Indo-Madagascar, com separação da porção Antártica e Australiana. **d.)** Madagascar já em sua posição atual, ainda no subcontinente conjunto com a Índia. **e.)** Completa separação entre Índia e Madagascar, que ao que tudo indica foi um processo prolongado e progressivo, não abrupto. **f.)** Rápida movimentação da Índia em direção a nordeste, que viria a colidir com a placa Asiática no Eoceno recente, cerca de 50 Ma.

Figura 1.2 – Distribuição atual de primatas Strepsirrhini vivos. Membros da superfamília Lemuroidea encontram-se restritos à ilha de Madagascar e os da superfamília Lorioidea têm membros na África sub-Saariana (família Galagidae e) e Sudoeste Asiático (família Lorisidae). Ilustração esquemática e simplificada da filogenia dos Strepsirrhini, dado a distribuição de taxa vivas. Mapa adaptado de Fleagle (1999); Yoder (1997).

Esse modelo de colonização por dispersão em jangadas foi bastante criticado por Simons (1976) e Stankiewicz et al. (2006). Alguns o consideram um dos grandes enigmas da biogeografia, principalmente devido à grande diversidade de Haplorrhini na porção continental africana, cujos membros nunca teriam chegado até a ilha (ver revisão em Masters et al., 2006). Entretanto, essa dispersão seletiva de primatas à ilha de Madagascar tem sido explicada pelo argumento de que os ancestrais Strepsirrhini teriam uma capacidade de reduzir suas taxas metabólicas através de torpor e hibernação (Kappeler, 2000; Martin, 1972; Masters et al., 2006; Yoder, 1996, 2003). Segundo essa hipótese os ancestrais primatas colonizadores da ilha seriam animais pequenos, noturnos de hábito arborícola e gregários que apresentavam certa capacidade de reduzir suas demandas metabólicas através de hibernação ou torpor (Kappeler, 2000), ou de heterotermia (Martin, 1972), como observado em alguns membros vivos da família Cheirogaleidae.

Atualmente existem trabalhos que podem ajudar a elucidar essa questão da colonização. Censky et al. (1998) e Calsbeek et al. (2003) relataram a capacidade de dispersão transoceânica recente de lagartos entre ilhas do Caribe. Além disso, modelagens paleo-oceanográficas também sugerem que as correntes oceânicas no canal de Moçambique teriam mudado de direção ao longo dos milhares de

anos (Ali and Huber, 2010; Krause, 2010). De acordo com os autores há 65 Ma, as correntes oceânicas estariam em uma direção que favorável para cruzar o continente africano até a ilha de Madagascar, estimando-se de 25-30 dias para se completar uma travessia em jangadas flutuantes (Krause, 2010). Entretanto, (Yang and Yoder, 2003) sugerem que a hipótese de pontes naturais ou saltando entre ilhas não apresenta suporte na datação da radiação de mamíferos em Madagascar, bem como pelo fato de não haver registros de flutuação considerável no nível do canal de Moçambique (cuja profundidade atual é de 3 km) desde sua separação final com a África (Yoder and Nowak, 2006).

1.1.3 Diversidade de Primatas de Madagascar

"May I announce to you that Madagascar is the naturalist's promised land? Nature seems to have retreated there into a private sanctuary, where she could work on different models from any she has used elsewhere. There you meet bizarre and marvelous forms at every step..."

Teissier's 1859 Unpublished letters, Philibert Commerson – sec XVIII

As espécies de primatas não-humanos de Madagascar são endêmicas e foram as únicas a ocupar esta parte do planeta até recentemente. O estabelecimento dos primeiros humanos data de aproximadamente dois mil anos atrás (Burney et al., 2004) e, talvez não por acaso, coincide com as extinções das 17 espécies de grandes subfósseis lêmures. A ilha de Madagascar ocupa a segunda posição na lista de países com maior número de espécies de primatas, enquanto apresenta uma área total equivalente a 7% do Brasil, que é o primeiro colocado.

A diversidade de lêmures chega a uma centena de espécies (Mittermeier et al., 2010) que ocupam diversos nichos em Madagascar tomados por outros grupos de primatas nos continentes (Fleagle and Reed, 1996). A extinção das 17 espécies de subfósseis reduziu drasticamente a diversidade de formas de lêmures (Wright and Jernvall, 1999). Atualmente, devido às práticas agrícolas de corte e queima, extração de carvão e caça, mais da metade das espécies viventes encontram-se de alguma forma ameaçadas de extinção, sendo considerados por alguns autores como os mamíferos terrestres mais ameaçados da atualidade (Schwitzer et al., 2014).

Antes da recente extinção dos subfósseis, o grupo ocupava todo o espectro de tamanho observado na diversidade da ordem de primatas: *Microcebus berthae*, cujo adulto chega ao máximo de 30g e 9 cm de tamanho corpóreo e é o menor primata do mundo, até o *Archaeoindris*, cuja estimativa é de 160kg, valor próximo ao de um gorila (Mittermeier et al., 2010). Atualmente, o maior lêmure vivente é o *Indri indri*, que apresenta cerca de 10kg e até 70 cm de tamanho corpóreo (Mittermeier et al., 2010). Acompanhando esse espectro de tamanhos também é possível detectar grande variação em características de história de vida relacionados ao tempo de geração, como idade de desmame e idade na primeira

reprodução.

Os membros desse clado ocupam diversos habitats, desde florestas tropicais com chuvas abundantes até áreas sujeitas a períodos prolongados de seca que podem chegar a oito meses de duração. Os lêmures são onívoros e apresentam diversidade na composição de dietas, variando nas proporções de frutos, seiva, néctar, resinas, flores, folhas e insetos (Mittermeier et al., 2008). Existem espécies que apresentam alto grau de especialização em sua dieta, por exemplo, os membros do gênero *Hapalemur* e *Prolemur*, que se alimentam apenas de determinadas partes de bambus. Algumas das características compartilhadas pelos representantes vivos indicam que seu ancestral tenha tido hábitos noturnos. Entre estas características estão um olfato e órgão vomeronasal bem desenvolvidos (utilizados na sinalização e demarcação territorial por ferormônios), rinário úmido e presença de *tapetum lucidum* na retina (que atua na reflexão de luz de volta para a retina, aumentando a capacidade visual noturna). Quanto a organização social, as espécies noturnas tendem a apresentar hábito de forrageamento solitário ou em pequenos grupos, mas na ilha também existem espécies diurnas organizadas em grupos extremamente territorialistas.

Nesta linhagem são reconhecidas cinco famílias com representantes vivos e três outras recentemente extintas, sendo que atualmente existe um consenso acerca da monofilia do clado de primatas endêmicos da Ilha de Madagascar (Dene et al., 1976; Mittermeier et al., 2008; Roos et al., 2004; Yoder, 2012; Yoder et al., 1996a; Yoder and Yang, 2004), incluindo os representantes subfósseis recentemente extintos (Karanth et al., 2005). As informações a seguir foram extraídas e resumidas a partir da edição mais recente do guia de campo para identificação de Mittermeier et al. (2010), utilizado neste estudo como principal referência para distribuição de espécies.

Cheirogaleidae, Gray 1873 Cinco gêneros (*Allocebus*, *Cheirogaleus*, *Microcebus*, *Mirza* e *Phaner*) e 30 espécies cujos pesos variam entre 30g e 400g. Todos os membros dessa família são animais quadrúpedes, arborícolas e noturnos, geralmente com corpo alongado e membros curtos. Os gêneros apresentam grande variedade de dietas compostas por néctar, seiva de árvores, insetos, flores e frutas. Uma característica notória de alguns membros desta família é a capacidade de permanecer durante tempo prolongado em torpor. Algumas espécies, como *Cheirogaleus medius*, hibernam por até nove meses durante as épocas de seca no sul da ilha. Durante esse período consomem as reservas de gordura acumuladas na cauda, o que leva ao nome popular da espécie "lêmure anão do rabo gordo".

30

Allocebus trichotis

Cheirogaleus medius

Microcebus berthae

Mirza zaza

1.1 Strepsirrhini

Lepilemuridae, Gray 1870 Um único gênero vivente e de taxonomia controversas desde a década de 1950, Lepilemur, com ao menos 26 espécies reconhecidas atualmente (maior parte descritas últimos 15 anos). Os membros desse grupo são saltadores e escaladores que passam a maior parte do tempo em posição vertical nos troncos de árvores. Apresentam porte médio e são notórios por seu hábito sedentário. Eles apresentam as menores taxas metabólicas dentro da ordem dos primatas, sendo a maior parte de sua dieta composta exclusivamente por folhas. Algumas espécies costumam competir com outras do gênero *Avahi* (os únicos representantes noturnos da família Indridae) pelo acesso a folhas de alto valor nutricional, e complementam a dieta com folhas com níveis elevados de alcaloides.

Lepilemur septentrionalis

Lemuridae, Gray 1821 É uma família diversa com 20 espécies e cinco gêneros, que costumam ser agrupados entre dois subgrupos definidos de acordo com sua dieta: os "lêmures verdadeiros", que são fundamentalmente frugívoros (*Eulemur*, *Varecia* e *Lemur*), e os "lêmures de bambu" (*Hapalemur* e *Prolemur*), cuja dieta consiste exclusivamente na ingestão de folhas ou demais porções de bambus (que contém taxas elevadíssimas de alcaloides). Algumas das espécies são exclusivamente diurnas, entretanto a maior parte delas apresenta hábito catemeral, onde os indivíduos mantêm picos de atividade tanto de dia quanto de noite. Esta é a única família vivente com um representante extinto descrito: *Pachilemur jully*, mais aparentado às Varecias.

Eulemur rubriventer

Varecia variegata

Lemur catta

Hapalemur griseus

Prolemur simus

Indridae, Burnett 1828 Três gêneros bastante distintos (*Avahi*, *Propithecus* e *Indri*), sendo que no primeiro encontram-se representantes exclusivamente noturnos e de pequeno porte, enquanto nos demais são indivíduos grandes e diurnos. Todos os membros dessa família são saltadores e escaladores verticais e que apresentam uma postura bastante incomum entre primatas, onde costumam descansar em posição vertical agarrados com membros anteriores e posteriores aos troncos de árvore e alternando sua locomoção entre saltos verticais de longa distância ao longo de galhos e bípedes no chão com ambos os membros anteriores elevados. Todos os representantes dessa família apresentam membros inferiores relativamente mais longos que os anteriores.

Avahi occidentalis *Propithecus verreauxi* *Indri indri*

Daubentonidae, Gray 1863 Família monotípica. O Aye-aye (*Daubentonia madagascariensis*) é o maior primata noturno, facilmente reconhecido por sua anatomia relacionada à dieta especializada em localizar larvas de insetos em ocas de troncos: usando o quarto dedo extremamente longo eles executam batimentos rápidos e consecutivos nos troncos e acompanhado da movimentação das amplas orelhas eles são capazes de localizar precisamente as larvas. Com a força dos músculos do pescoço utilizam os incisivos para cavar buracos no tronco de árvores. Com o dedo médio (extremamente fino e capaz de rotacionar em todas as direções) e utilizam sua *grooming claw* para capturar as larvas de dentro dos troncos. Sua dentição se assemelha a de roedores, com incisivos de crescimento contínuo, e caninos e pré-molares ausentes. Estudos moleculares recentes o posicionam como grupo irmão dos demais primatas de Madagascar, os demais Lemuriformes compondo um grupo monofilético.

D. madagascariensis

Subfósseis Apesar da considerável diversidade de lêmures de Madagascar, um viajante a cerca de mil anos atrás teria uma impressão muito mais impactante ao chegar à ilha. Estima-se que os primeiros humanos tenham chegado por volta de 2,3 mil anos atrás. Desde então, a ilha perdeu mais de 90% de sua cobertura florestal original, 7 espécies de carnívoros, 21 de aves e 3 de répteis e 17 espécies de subfósseis lêmures. Notavelmente maiores que as espécies viventes, representavam 15% do total de primatas de Madagascar. O termo *subfóssil* se deve ao fato de terem sido extintos recentemente. Datações de rádio carbono estimam uma média de 1 – 2,5 mil anos, sendo que apenas dois sítios apresentavam materiais anteriores a 10 mil anos. Considerando a idade do clado dos primatas, há de se convir que tanto os lêmures viventes quanto os extintos são contemporâneos da mesma fauna.

Note o tamanho dos 8 gêneros extintos de subfósseis em relação à silhueta em preto à esquerda, que representa o maior vivente atual: *Indri indri*. Reconstruções feitas por S.D. Nash (Mittermeier et al., 2010)

1.1.4 Madagascar: Estrutura climática

Atualmente, a ilha está posicionada a 400 km da costa leste do continente Africano, 4 mil km da Índia, 5 mil km da Antártica e 6 mil km da Austrália, sendo que o trópico de Capricórnio separa o terço de sua porção mais a sul ($23^{\circ}26'16''S$). Com uma área total de 587.000 km^2 , esta é a quarta maior ilha do mundo, com superfície maior que a porção continental da França.

Os regimes climáticos atuais da ilha estão diretamente relacionados ao seu posicionamento a oeste do encontro das massas de vento norte-sul da zona de convergência intertropical. Esse encontro de massas gera uma sazonalidade oscilatória, sendo que o clima é dominado pelos ventos sudoeste originados em centros de alta pressão atmosférica no Oceano Índico. A atuação dessas massas de ar na complexa topografia da ilha (platô central que se estende por toda orientação latitudinal) leva à extrema assimetria no regime de chuva entre as porções Leste e Oeste. Essa assimetria se reflete na tradicional visão de estudos biogeográficos de separação da ilha nesses dois extremos. A ilha tem uma sazonalidade bem marcada, apresentando uma estação quente e chuvosa (novembro a abril) e outra fria e seca (de maio a outubro). Também há considerável imprevisibilidade climática e a ilha é assolada por diversos ciclones tropicais ao longo do ano. Por exemplo, em 2004, o ciclone Gafilo (Figura 1.1.4), o pior desde 1927, matou 172 pessoas e deixou mais de 200 mil desabrigadas, levando a um estrago em infraestrutura de rodovias, cidades e agricultura estimado em 250 milhões de dólares.

A ilha encontra-se extremamente ameaçada devido a problemas com manejo do fogo e extensiva prática de corte-queima em cultivos agrícolas. Brown and Yoder (2015) realizaram um estudo avaliando a predição de distribuição de 57 espécies de lêmures na ilha a partir de modelagem climática futura, com o intuito de avaliar os impactos das mudanças climáticas nas prováveis áreas de distribuição geográfica e abundância de espécies de lêmures. Os resultados dos autores indicam que 35 delas irão sofrer contração de suas áreas de distribuição nos próximos anos. Além disso, esses autores prevêem a extinção de três espécies (*Lepilemur microdon*, *Lepilemur hubbardorum* e *Microcebus danfossi* (Brown and Yoder, 2015).

Com o intuito de ambientar o leitor ao cenário da ilha, elaborei um breve resumo a respeito do zonamento bioclimática de Madagascar – baseado no apêndice B do guia de campo para identificação de Mittermeier et al. (2010), na parte 1 de Goodman and Jungers (2014), e como representadas nos mapas da Figura 1.1.4 (Vences et al., 2009).

Domínio central: Sub-úmido Na porção central da ilha encontra-se um platô de elevação entre 800 – 1.300 m com alguns picos que chegam a 2.000 m. Esse domínio cobre cerca de 40% da área total da ilha e é marcado pela ausência de estação seca, com pluviosidade anual de 1.500 mm e florestas com dosséis entre 20 e 25 m. Apesar de ser o domínio mais extenso de Madagascar, a vegetação original foi bastante devastada pela prática de corte e queima, de forma que pouco se sabia acerca de sua biota na-

tural até o final da década de 90 (Pearson and Raxworthy, 2009). Estudos paleoambientais recentes demonstram que as florestas de Madagascar sofreram diversas flutuações ao longo dos últimos milhares de anos (Burney et al., 2004), sugerindo que a origem das formações de gramíneas não são totalmente antropogênicas. O limite leste deste domínio é demarcado por uma quebra abrupta de altitude, com a formação de escarpas elevadas pouco antes de adentrar a porção da costa voltada ao Oceano Índico. A oeste, entretanto, essa redução de altitude é mais gradual, levando a um contraste na declividade no sentido leste-oeste da ilha. Além disso, as cadeias de montanhas deste domínio encontram-se alinhadas no sentido norte-sul da ilha, mas consideravelmente deslocadas mais a leste. Esse deslocamento leva a uma assimetria considerável na quantidade de água que drena para oeste, que corresponde a 70% da malha hidrográfica. O sistema fluvial acompanha o terreno e também apresenta contraste entre os lados: a leste os rios são mais curtos e de queda abrupta, enquanto a oeste são mais extensos e meândricos, formando grandes deltas que desagüam no Canal de Moçambique. Essas diferenças tem efeitos potenciais na capacidade de dispersão de animais, associados principalmente a suas capacidades de ultrapassar barreiras.

Figura 1.3 – a) Zonas climáticas simplificadas úmido e montanha correspondem aproximadamente a biomas florestais, sub-úmido com florestas e pradarias, seco florestas decíduas e sub-árido florestas xerófitas. **(e)** Principais áreas biogeográficas para distribuição de lêmures (ambas adaptadas de Vences et al., 2009). Acima: Imagem de satélite ilustrando a dimensão do ciclone tropical Gafilo (destacado em vermelho) que assolou a ilha em 2004.

Domínio Leste: úmido Marcado por florestas úmidas onde a precipitação média anual entre 2.000–3.000 mm e não existe estação seca. Elevação máxima de 800 m, dossel sempre verde de 20-30 m, vegetação que se estende ao longo de toda a costa leste da ilha, mas apresenta alto grau de devastação.

Domínio Oeste: Seco Vegetação consiste principalmente de uma paisagem descontínua de florestas decíduas, desde a costa até o platô cárstico a leste com elevação máxima de 80 m. Nessa porção da ilha a pluviosidade média anual está entre 500 e 2.000 mm, sendo que ao sul as chuvas são mais escassas.

Existe uma estação seca bem demarcada a cada 7 meses, quando as plantas perdem suas folhas. O domínio se estende por praticamente metade da porção oeste da ilha, mas o mesmo tipo de vegetação também é encontrado em uma área do extremo norte da ilha.

Domínio Sul: Sub-árido Caracterizado por uma vegetação xerófito, elevação variando desde a costa até 400 m e pluviosidade esparsa e irregular, variando de 300 a 800 mm, gerando uma estação seca longa (até 9 meses) e demarcada. 5

Montanhas elevadas Com altitudes entre 2.000 e 2.867 m existem 5 principais picos montanhosos na ilha: Tsaratanana, Marojejy, Ankatra, Andrigitra e Andohahela, que apresentam grande amplitude térmica ao longo do dia e sazonalidade marcada. Apesar de apresentarem baixa concentração de espécies quando comparadas com as demais regiões, existe elevada taxa de endemismo. 10

É bastante comum na literatura primatológica argumentarem que os lêmures estão sujeitos aos níveis mais elevados de estresse energético dentre os primatas e os principais traços de história de vida das espécies costumam ser atribuídos à extrema sazonalidade demarcada pelos invernos secos (Peireira, 1993). Dunham et al. (2013), por outro lado, mostrou que o grau de sazonalidade a qual os primatas de Madagascar estão sujeitos é equivalente ao de alguns Haplorrhini. Entretanto, a variabilidade interanual é mais acentuada em Madagascar, levando a uma extrema imprevisibilidade nas flutuações sazonais experienciadas pelas populações da ilha. Assim, mesmo espécies que habitam ambientes sem sazonalidade extrema e com disponibilidade de recursos ao longo de todo o ano também enfrentam estresse associado a ambientes desafiadores (Tennenhouse, 2015). 15

1.1.5 Lêmures: Uma radiação adaptativa? 20

Os lêmures são um clado muito mais diverso que seu clado irmão, dos Lorisiformes (famílias Lorisidae e Galagidae). Usando a estrutura filogenética desse clado apresentada na Figura 1.6 como referência, algumas características nos chamam a atenção a respeito dos primatas de Madagascar. 1.) Houve um aumento nos eventos de diversificação em dois principais períodos: um durante o Oligoceno, entre 25–20 Ma e outro depois de 20 Ma. 2.) A ausência de registros fósseis em posições profundas para o clado dos lêmures, sendo que não existem registros do grupo de primatas da ilha até o Holoceno (< 0.01 Ma), onde *Babakotia radafolia*, o subfóssil mais antigo tem idade máxima estimada em 4,8 mil anos (Behrensmeyer and Turner, 2015). 25

Madagascar tem uma biota tropical peculiarmente diversa que evoluiu em um longo tempo de isolamento. O conjunto de sua biota pode ser caracterizado por gradientes ambientais marcados regionalmente e localmente abruptos, sendo que os taxa que chegaram à ilha apresentam padrões comuns de microendemismo (Vences et al., 2009). Estudos acerca da filogeografia dos clados de vertebrados da ilha levaram a hipótese de que as espécies teriam evoluído via especiação ecológica em diferentes 30

nichos de habitat, seguido por vicariância relacionada principalmente a rios atuando como barreiras na dispersão (Pastorini et al., 2003). Uma hipótese alternativa seria a de que a composição micro-endêmica observada seria resultado de eventos de vicariância mais recentes relacionados a oscilações climáticas (Wilmé et al., 2006).

5 Como busquei exemplificar ao longo da Subsubseção 1.1.3, atualmente os lêmures ocupam uma miríade de nichos, desde copas das florestas tropicais úmidas até ambientes desérticos abertos com vegetação xerófila. Historicamente, na literatura que se propõe a investigar padrões e processos de diversificação das espécies de lêmures, predomina a hipótese de que a diversificação do clado evoluiu via radiação adaptativa (Martin, 1972), num cenário em que o ancestral lêmure ao colonizar a ilha teria
10 se deparado com oportunidades ecológicas antes indisponíveis na porção continental africana.

A estrutura filogenética ressaltada anteriormente, quando combinada com a de demais vertebrados, sugere que a chegada de predadores e competidores não-lêmures influenciou o padrão de diversificação observado. Além dos lêmures, quatro outras ordens de mamíferos apresentam clados nativos da ilha, dos quais apenas os morcegos não são monofiléticos (devido a eventos múltiplos de coloniza-
15 ção). A chegada dos outros mamíferos terrestres como tenrecídeos (42-25 Ma), roedores (24-20 Ma) e carnívoros (26-19 Ma) indica que os primeiros lêmures a atingirem a ilha (entre 50-60 Ma³) estiveram sem competidores ou predadores (aves e mamíferos) até relativamente recentemente (entre 5-30 Ma) –a extinta Ave-Elfante, única exceção, parece ter ocupado a ilha desde o Cretáceo (Yoder and Nowak, 2006).

20 Ainda existem lacunas no entendimento de mecanismos responsáveis pela diversificação desse grupo de primatas. Principalmente devido às características geológicas da ilha, que dificultam a preservação de registros fósseis, pouco se sabe sobre a fauna mais antiga da ilha. Depósitos de pólen foram usados em interpretações de alterações climáticas no último máximo glacial do Pleistoceno tardio, mas estes depósitos são considerados recentes quando comparados com a idade do clado (apenas
25 40 mil anos atrás) e de documentação limitada geograficamente (Goodman and Jungers, 2014). Além disso, a extinção recente dos subfósseis lêmures causou uma dramática redução na diversidade do clado (Godfrey et al., 1999; Wright and Jernvall, 1999), que também deve ser considerada nos estudos de diversificação deste clado.

1.2 Embasamento teórico

30 *Como podemos estudar a evolução fenotópica?*

Ao observar a expressão de caracteres fenotípicos na natureza notamos a presença de algum grau de variação, seja entre indivíduos de uma mesma população ou entre populações distintas. Tal variação

³Devido a ausência de fósseis datados depois Cretáceo, as inferências a cerca da origem de organismos colonizadores de Madagascar são baseadas em divergência molecular.

pode ser discreta (ex. flores brancas ou vermelhas) ou contínua (ex. flores brancas até vermelhas mas passando pelo rosa como um degradê contínuo indo de um extremo ao outro). Altura ou tamanho, são exemplos clássicos de caracteres contínuos de extrema relevância para a evolução dos organismos na natureza. Estes caracteres são geralmente poligênicos, ou seja, existe um número grande de locus envolvidos na expressão dos fenótipos. Esse grande número de locus de pequeno a médio efeitos leva à distribuição normal das medidas de caracteres contínuos observada nas populações (Fisher, 1930).

Até recentemente era difícil descrever as frequências alélicas desses caracteres poligênicos precisamente de forma a quantificar as diferenças fenotípicas de acordo com suas possíveis combinações alélicas. Atualmente, com cruzamentos controlados em laboratório entre colônias purificadas (ex. clones ou linhagens homozigotas exclusivas) é possível determinar o efeito de cada combinação e até mesmo quantificar efeitos de interação entre alelos múltiplos (e.g. epistasia) relacionados a determinado fenótipo complexo (Barton and Keightley, 2002; Mackay et al., 2009). Com o avanço das práticas com marcadores moleculares atualmente podemos chegar a uma resolução maior na identificação de QTLs (Quantitative Trait Loci, em inglês) relacionados a tais caracteres quantitativos em linhagens de laboratório.

Esses progressos na resolução dos mapeamentos genéticos foram alcançados apenas ao final da década de 1990, mas as bases da teoria de genética de populações foram elaboradas a partir de parâmetros genéticos como as frequências alélicas que eram muito difíceis de mensurar na prática da época. Quando revemos o histórico da teoria evolutiva fenotípica, vemos que ele apresenta uma base formal na teoria da genética de populações para descrever caracteres contínuos. Entretanto, o tipo de dados a que os cientistas das décadas de 1930 – 1940 tinham acesso eram em termos de caracteres fenotípicos (de distribuição contínua), e não em termos de frequências alélicas exatamente. Isso fica mais evidente nos livros da síntese moderna, como em *Tempo and Mode in Evolution* de George Gaylord Simpson (1944), que era paleontólogo.

Dessa forma, a teoria de evolução fenotípica não foi fundamentada em estimativas de frequências alélicas. Alternativamente, Simpson se baseou em representações gráficas adaptadas do conceito de paisagem adaptativa vinda de Sewall Wright (Wright, 1932) para estudar a evolução de caracteres quantitativos (Arnold, 2014; Arnold et al., 2001; Dietrich and Skipper Jr, 2012), substituindo frequências gênicas pelas médias de valores fenotípicos.

Esses modelos de representação gráfica só foram formalizados matematicamente na década de 1970 por Russel Lande, que se baseou nos trabalhos de Pearson (1903), Dickerson (1955), Falconer (1960), Kimura (1965), Robertson (1966) entre outros. Esse autor desenvolveu modelos parametrizados a partir de medidas de tamanhos populacionais e de gradientes de seleção. Esses modelos poderiam ser utilizados para determinar as diferenças quantitativas fenotípicas através da medida da semelhança entre indivíduos de uma geração para a outra. Nesse contexto foi construindo o arcabouço da genética

quantitativa multivariada que compõe as bases das análises desenvolvidas neste projeto.

1.2.1 Breve histórico do estudo de evolução fenotípica

Darwin desconhecia os trabalhos realizados por Mendel a respeito dos mecanismos de transmissão de caracteres discretos (e.g. cores e texturas das sementes de ervilhas) e descrever a herança de caracteres quantitativos foi um problema que não conseguia resolver. Enquanto isso, sua teoria de evolução por seleção natural proposta em 1859 chamou a atenção de Galton, pai da estatística moderna e seu primo de primeiro grau.

Interessado principalmente na relação de semelhança fenotípica entre parentes, Galton foi o primeiro a aplicar sistematicamente conceitos matemáticos à área da biologia para descrever e quantificar a similaridade entre pais e filhos, dando origem ao campo da biometria. Em seu livro de 1894, *Natural inheritance*, já ressalta que muitos caracteres contínuos na natureza (ex. altura de indivíduos em uma população, tamanho de folhas) seguem uma distribuição aproximadamente normal quando na escala apropriada.

No começo do século XX os trabalhos de Mendel foram redescobertos pela comunidade científica e na época foi um grande problema conceitual conciliar os conceitos da escola Biometricista com as idéias de Mendel (Provine, 1971). Enquanto os Mendelianos favoreciam a noção de evolução em saltos discretos, os biometricistas viam variações contínuas como produto da evolução. Mas ainda não era claro se os mecanismos propostos originalmente para caracteres discretos seriam capazes de lidar com variação contínua. Além disso, os Biometricistas estavam bastante intrigados com o problema da regressão de médias de pais e filhos: onde o coeficiente de inclinação é geralmente diferente de um e tem o intercepto maior do que zero (ou seja, não há uma perfeita correspondência e manutenção temporal de caracteres entre gerações). Nesse momento, não parecia possível que a evolução de caracteres contínuos fosse um processo estável, pois sempre haveria uma diferença entre as médias das gerações subsequentes (Roff, 1997).

Foi Fisher, que elaborou a estatística moderna, quem conciliou os mecanismos mendelianos de herança originalmente propostos para lidar com caracteres discretos com poucos alelos ao dilema enfrentado pelos biometricistas. Em 1918 formalizou uma solução matemática para este problema, atribuindo à variação de caracteres quantitativos um número muito grande de genes de pequenos efeitos aditivos que segregam de acordo com as regras mendelianas. Neste modelo, o valor final do fenótipo de determinado indivíduo depende da combinação desses fatores. Essa proposta acabou com o problema da regressão das médias, onde o erro do modelo biometricista foi manter o valor da regressão e das frequências alélicas como constante entre as gerações. Entretanto, essa regressão só permanecerá constante caso não haja alterações ambientais, nem mudanças nas frequências alélicas, o que pode ser alterado num cenário em que haja a ação de seleção (Roff, 1997).

O grau de semelhança entre pais e filhos pode variar bastante dependendo do total de variância observada na população e das base genéticas do caráter em questão. Essa variação de semelhança entre gerações foi fonte de foco de diversos criadores de animais e plantas e até hoje ocupa uma posição fundamental nos estudos de evolução fenotípica. É através desse grau de semelhança que podemos descrever as propriedades genéticas de determinada população e prever a resposta fenotípica à ação 5 de processos evolutivos como seleção natural (Falconer and Mackay, 1996).

Para melhor compreender a importância dessa medida de semelhança para os estudos de evolução fenotípica farei uma breve recapitulação dos princípios dos modelos por trás da teoria de genética quantitativa aplicados ao estudo da evolução de caracteres contínuos. Começarei a partir do cenário com um único locus, expandindo para o modelo de múltiplos locus, indo do contexto univariado para 10 o multivariado.

1.2.2 Genética quantitativa

Existem duas abordagens para elaborar modelos em genética quantitativa (Roff, 1997): A primeira delas parte de um único locus com dois alelos segregando. Nela o valor genotípico de determinado indivíduo em uma população é a soma de um componente aditivo, o chamado valor de acasalamento (A – uma 15 medida teórica que pode ser obtida através do valor médio de sua prole gerada em acasalamentos aleatórios com a população atual) desvio de efeito de dominância (D – devido aos efeitos de interação dos seus alelos). A outra abordagem considera que existe um número muito grande de loci envolvidos na expressão de caracteres contínuos, cada qual com efeitos pequenos que descrevem uma distribuição normal (Bulmer et al., 1980; Fisher, 1918). 20

Em uma dada população, a variação fenotípica total em caracteres contínuos (σ_P^2) numa geração é composta por uma porção genética que é de fato herdada, a chamada variância genética aditiva (σ_A^2 – medida como os valores de acasalamento), outra porção devido a efeitos genéticos não herdáveis como dominância (σ_D^2 – devido a interação entre alelos de um mesmo loci) e epistasia (σ_I^2 – devido a 25 interação entre diferentes locus), e outra devido aos efeitos ambientais (σ_E^2). Essa partição da variância fenotípica em seus componentes básicos é sumarizada da seguinte forma (Falconer and Mackay, 1996):

$$\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2 + \sigma_I^2 + \sigma_E^2 \quad (1.1)$$

A variação que se deve à porção genética não-aditiva apresentada na Equação 1.1 costuma ser considerada de menor relevância devido a uma derivação do trabalho de Fisher (1958), que argumenta que as consequências de tais efeitos também dependem da base genética em que são expressos. Dessa forma, mesmo que haja efeitos epistáticos relevantes, sua contribuição se dará fundamentalmente por 30 sua porção aditiva (Roff, 1997) e os genes contribuem cada um de maneira relativamente independente.

Quando pensamos em um único caráter, a proporção da variância fenotípica total correspondente à variância aditiva é chamada de herdabilidade (h^2) (Falconer and Mackay, 1996; Lynch and Walsh, 1998). Por ser uma proporção, além de depender das bases genéticas de herança (σ_A^2), a herdabilidade também depende do total de variação apresentado na população (σ_P^2).

$$h^2 = \frac{\sigma_{A1}^2}{\sigma_{P1}^2} \quad (1.2)$$

5 Num contexto univariado, a resposta evolutiva de determinado caráter ($\Delta \bar{z}_1$) é calculada como diferença entre as médias pares de gerações subsequentes. A previsão de tal resposta evolutiva pode ser obtida pela equação do criador $R = h^2 S$ (Lush, 1937) onde R é a resposta à seleção em uma geração e S o chamado diferencial de seleção representa a diferença nas médias da população antes e depois do evento de seleção. No chamado "folk theorem":

$$\Delta \bar{z}_1 = h_1^2 \Delta_s \bar{z}_1 \quad (1.3)$$

10 fica mais claro que resposta pode ser obtida através do produto entre a herdabilidade e a diferença entre a média fenotípica dos parentais da próxima geração e a população como um todo antes da seleção ser aplicada.

A previsão da resposta evolutiva depende então da estimativa de parâmetros importantes a respeito do caráter de interesse: a semelhança entre gerações subsequentes dada pela variância genética aditiva (15 (σ_{A1}^2)); a quantidade de variação total observada na população (σ_{P1}^2); a covariância entre o caráter em questão e a aptidão (S_1) (Falconer and Mackay, 1996). Para o caráter z_1 , a equação anterior pode ser reescrita na forma de:

$$\Delta \bar{z}_1 = \frac{\sigma_{A1}^2}{\sigma_{P1}^2} S_1 = \sigma_{A1}^2 b_1 \quad (1.4)$$

onde a força de seleção naquele caráter em particular (b_1) é obtida pelo coeficiente de inclinação da reta de regressão da aptidão no caráter de interesse.

20 Entretanto, pressões de seleção raramente atuam em um único caráter isolado ou em um par exclusivo de caracteres, mas sim no organismo como um todo (Roff, 2000). Assim sendo, para avaliar a evolução de estruturas morfológicas e não apenas um único caráter, a resposta fenotípica média às pressões de seleção não depende apenas da herdabilidade de cada caráter em isolado. Além disso, no contexto multivariado a resposta evolutiva não depende apenas de pressões de seleção diretas nos 25 caracteres, mas também do grau de associação com os demais componentes do organismo. Mesmo

que o foco da seleção seja um caráter em particular, caracteres com os quais este está correlacionado também responderão indiretamente à seleção. Podemos pensar na resposta evolutiva à pressões de seleção como um conjunto orquestrado de respostas entre as diversas partes que compõe a estrutura ou organismo. Essa resposta depende diretamente das bases genéticas e da forma como os caracteres encontram-se relacionados (Lande, 1979). Além da herdabilidade de cada caráter em particular, o grau de associação entre as partes que compõe a estrutura ou organismo é fundamental para compreender a evolução fenotípica pois tais associações implicam em respostas indiretas a pressões de seleção.

Apresentação do modelo: a equação de Lande (1979)

Desde os anos 1930 os primeiros geneticistas quantitativos notaram a relevância que correlações genéticas apresentavam à evolução dos fenótipos. Ao longo dos anos 1930 até os 1970 através de estudos de criadores de animais e plantas foi sendo elaborada a teoria e as análises estatísticas de evolução de caracteres individuais (ver breve revisão em Via and Hawthorne, 2005). Foi nos meados dos anos 1970 que a teoria da genética quantitativa voltou à atenção dos biólogos evolutivos e Lande (1975, 1976) ilustrou como a equação do criador poderia ser aplicada à evolução fenotípica multivariada.

Ao descrevermos o total de variação em caracteres contínuos exploramos essencialmente dois parâmetros populacionais: a *variância*, que diz respeito à distribuição dos valores individuais em torno da média populacional e a medida da associação entre os pares de caracteres na população, que é definida pela *covariância* entre eles. Essa estrutura de associação multivariada pode ser sumarizada em matrizes de variância e covariância. Elas são organizadas de maneira em que na diagonal encontram-se as variâncias de cada caráter e nos demais elementos estão as respectivas covariâncias entre os pares de caracteres, como indicado a seguir:

$$\begin{bmatrix} \sigma_1^2 & cov_{1,2} & \cdots & cov_{1,n} \\ cov_{2,1} & \sigma_2^2 & \cdots & cov_{2,n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ cov_{n,1} & cov_{n,2} & \cdots & \sigma_n^2 \end{bmatrix}$$

No arcabouço teórico da genética quantitativa, a variância genética aditiva dos caracteres é resumida na Matriz **G**, que resume a estrutura da porção da variação fenotípica que é efetivamente herdada de uma geração para a seguinte. Nela também é quantificada a associação entre genes devido a pleiotropia e desequilíbrio de ligação que levam a covariação entre os caracteres (Walsh, 2001). Lande estendeu a Equação 1.2.2 do criador ao contexto multivariado usando algebra matricial. Ele foi o primeiro a aplicar estes conceitos a problemas evolutivos em considerando a porção da resposta indireta que se deve à correlação entre os caracteres, como expresso na equação de resposta multivariada à seleção de Lande (1979) :

$$\Delta \bar{z} = \mathbf{G}\mathbf{P}^{-1}\mathbf{S} = \mathbf{G}\boldsymbol{\beta} \quad (1.5)$$

onde $\Delta \bar{z}$ é o vetor de resposta evolutiva que representa as diferenças entre as médias de cada caráter antes e depois da seleção, $\mathbf{G}$ é a matriz genética aditiva e $\mathbf{P}^{-1}$ é a inversa da matriz fenotípica. O produto entre a inversa de $\mathbf{P}$ e $\mathbf{S}$, o diferencial de seleção, gera o vetor $\boldsymbol{\beta}$. Esse vetor de gradiente de seleção indica a direção e a intensidade da seleção em cada caráter isolado descontando a porção indireta de seleção devido à correlação com os demais caracteres. Em estudos de campo ou em laboratório $\boldsymbol{\beta}$ pode ser obtido através dos coeficientes parciais de regressão da aptidão nos caracteres.

$$\begin{bmatrix} \Delta \bar{z}_1 \\ \Delta \bar{z}_2 \\ \vdots \\ \Delta \bar{z}_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sigma_1^2 & cov_{1,2} & \cdots & cov_{1,n} \\ cov_{2,1} & \sigma_2^2 & \cdots & cov_{2,n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ cov_{n,1} & cov_{n,2} & \cdots & \sigma_n^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_n \end{bmatrix}$$

A matriz $\mathbf{G}$ no contexto da paisagem adaptativa

A matriz $\mathbf{G}$ é um parâmetro central na teoria evolutiva fenotípica multivariada por afetar profundamente a resposta fenotípica média às pressões de seleção (Lande, 1979, 1980b; Lande and Arnold, 1983). Assim como no caso univariado, a estrutura total de variância e covariância fenotípica (representada na Matriz fenotípica $\mathbf{P}$) pode ser particionada da seguinte maneira:

$$\mathbf{P} = \mathbf{G} + \mathbf{E} + \mathbf{G} \times \mathbf{E} + r_{GE} \quad (1.6)$$

onde $\mathbf{G}$ representa a porção genética, e $\mathbf{E}$ os efeitos ambientais. Dessa forma, uma porção de $\mathbf{P}$ deve-se ao somatório das influências genéticas ambientais, outra caracteriza a interação entre estes fatores e uma outra que diz respeito a correlação entre genótipo e ambiente. A correlação observada entre caracteres fenotípicos também pode ser causada por efeito de pleotropia e/ou desequilíbrio de ligação (Lande, 1979; Lynch and Walsh, 1998). Dessa forma, alterações nas correlações genéticas tem consequências à evolução fenotípica. Mudanças nas frequências alélicas de genes subjacentes a determinado caráter devido a processos evolutivos também produzirão respostas correlacionadas nos demais caracteres influenciados pelo mesmo conjunto de genes.

Além disso, dependendo da estrutura de variação presente em $\mathbf{G}$ e de seu posicionamento em relação à paisagem adaptativa a trajetória evolutiva fenotípica poderá ser enviesada (Lande, 1979; Lande and Arnold, 1983), não dependendo apenas da força e direção da seleção (Hansen and Houle, 2008). A Figura 1.2.2 ilustra esta questão. Com este conjunto de parâmetros, os modelos da genética quantita-

tiva nos permitem fazer previsões acerca das mudanças nas médias de caracteres fenotípicos quando se conhece a direção e intensidade do gradiente de seleção aplicado na população (Kirkpatrick and Lofsvold, 1992; Lande and Arnold, 1983).

Figura 1.4 – Representação da estrutura de variação e covariação genética de duas populações (em roxo) em uma mesma paisagem adaptativa onde a cor representa o valor de aptidão dado pelo relacionamento entre os caracteres Z_1 e Z_2 . Nessa representação metafórica da paisagem adaptativa, o vetor de gradiente de seleção β pode ser entendido como a declividade do terreno. Na paisagem existem dois picos (1 em vermelho mais escuro, com maior aptidão que o 2, em vermelho mais claro) e um vale (em azul). Em **a** a população apresenta a mesma quantidade de variação moderada em ambos os caracteres, entretanto nenhuma covariação entre eles, como indicado pela representação circular. Nesse caso a população irá responder à seleção como indicado pela seta e seguir diretamente em direção ao pico 1, o ótimo global da região dos espaço dos caracteres. No caso de **b**, a população apresenta grande covariação entre os dois caracteres, como indicado pela representação em elipse alongada, mostrando que há maior concentração de variação em determinados arranjos dos caracteres. Nesse caso, existe pouca variação disponível na direção alinhada com a orientação do pico 1 e a população responderá de acordo com o eixo de maior variação, podendo cruzar a região amarela de menor aptidão até chegar ao pico 2, como representado pela seta. Adaptado da figura 1 de Steppan et al. (2002).

Conjectura de Cheverud

A estimativa de matrizes $\mathbf{G}$ confiáveis requer um modelo de partição de variância capaz de determinar a porção de variação genética aditiva de acordo com a estrutura de relacionamento genealógico entre os sujeitos amostrados, o chamado modelo animal simples (Lynch and Walsh, 1998). Devido ao processo de amostragem e delineamento experimental, esta tarefa requer grandes esforços. O principal requerimento para uma estimativa de $\mathbf{G}$ é conhecer os relacionamentos acerca das relações de parentesco entre indivíduos na população (Falconer and Mackay, 1996; Lynch and Walsh, 1998).

Na estimativa de $\mathbf{G}$ as unidades amostrais passam a ser famílias, o que envolve centenas de indivíduos. Portanto, devido às dificuldades de delineamento experimental, o tamanho amostral de estimativas de $\mathbf{G}$ reportadas na literatura geralmente é de uma ordem de magnitude menor em relação às estimativas de matrizes fenotípicas $\mathbf{P}$ (Roff, 1997). Esse baixo tamanho amostral acaba por gerar um maior acúmulo de erros na estimativa das matrizes $\mathbf{G}$. Além disso, mesmo quando tais condições são satisfeitas, estimativas de $\mathbf{G}$ ainda estão sujeitas a erros maiores que aqueles encontrados para a estimativa de $\mathbf{P}$ (Arnold and Phillips, 1999; Cheverud, 1988; Hill and Thompson, 1978; Marroig et al., 2012; Meyer and Kirkpatrick, 2008; Roff, 1997).

Dada a importância da Matriz $\mathbf{G}$ para o estudo de evolução fenotípica multivariada no contexto da genética quantitativa, Cheverud (1988) realizou uma ampla investigação comparando 41 pares de

Matrizes **G** e **P** reportadas na literatura. O autor constatou que existe elevado grau de similaridade no padrão de covariância apresentado pela matriz genética e sua correspondente fenotípica e coloca que **P** pode ser usada como uma boa substituta de **G**.

Dessa forma, investigações baseadas na teoria da genética quantitativa acerca da evolução morfológica de populações contemporâneas podem se valer de matrizes **P**, estimadas a partir de um tamanho amostral apropriado à dimensão da matriz como substitutas de suas respectivas **G** (Agrawal and Stinchcombe, 2009; Marroig et al., 2004; Oliveira et al., 2009; Porto et al., 2009; Steppan, 1997). Essa substituição traz diversas vantagens para estudos evolutivos principalmente em relação aos esforços de delineamento amostral. Entretanto, para que tal substituição seja feita é necessário verificar o comportamento de tais matrizes.

A chamada *Conjectura de Cheverud* (Roff, 1995) se baseia principalmente no pressuposto de que tanto as fontes internas (genotípicas) quanto externas (ambientais) de variação atuam sobre as mesmas vias de desenvolvimento. Essa dinâmica de desenvolvimento atua como seleção estabilizadora interna (Cheverud, 1984) e seria compartilhada em sua maior parte entre os organismos próximos. Essa conjectura foi testada por diversos autores para diferentes sistemas de caracteres, incluindo caracteres morfológicos e cranianos (Dochtermann, 2011; Garcia et al., 2014; Reusch and Blanckenhorn, 1998; Roff, 2012; Roff and Fairbairn, 2011; Roff, 1995) e parece se aplicar aos crânios de mamíferos (Garcia et al., 2014).

Muitos estudos de genética quantitativa são realizados a partir de estimativas de **P**, que podem ser aplicadas em estudos evolutivos a longo prazo caso haja certa constância entre as matrizes das populações e seus ambientes (Barton and Turelli, 1989). Entretanto, a estabilidade de **G** ao longo do tempo evolutivo ainda é foco de diversos estudos em biologia evolutiva.

1.2.3 A estabilidade de **G** ao longo do tempo

Como ressaltado por Turelli (1988), a genética quantitativa teórica apresenta duas linhas de pesquisa principais. A primeira estuda o comportamento da porção herdável nas populações ao longo das gerações e a segunda se ocupa da investigação da evolução fenotípica. Os trabalhos dessas duas áreas vem sendo conectados principalmente com os avanços das pesquisas em torno do mapa genótipo-fenótipo (e.g. evo-devo, plasticidade, QTL).

Os trabalhos teóricos a respeito da evolução de **G** se propõem fundamentalmente a verificar 1) como o balanço mutação-seleção poderia manter a variância aditiva; 2) se o modelo alélico de distribuição normal proposto por Lande é capaz de prever as dinâmicas dos parâmetros envolvidos. No modelo proposto por Lande (1979), as respostas fenotípicas às pressões de seleção podem se dar por alterações na matriz **G** atribuídas a perturbações ambientais, mutação, recombinação, efeitos de deriva genética, seleção dependente de frequência ou seleção direcional. Entretanto, segundo Turelli (1988),

mesmo sem haver qualquer mudança genética, $\mathbf{G}$ pode sofrer alterações caso haja interação com a matriz ambiental ($\mathbf{E}$). Este autor propõe que a dinâmica evolutiva das matrizes deveria ser modelada, então, como uma função gaussiana da aptidão. Mas, neste caso, passaríamos a lidar com parâmetros extremamente difíceis de mensurar em populações naturais (como, por exemplo, magnitude de seleção e mutação ou o número de alelos segregando por locus). Entretanto, em 1979 Lande já havia argumentado que mesmo em ambientes dinâmicos $\mathbf{G}$ deve estar próxima ao equilíbrio determinado por mutação/seleção/recombinação. Dessa forma, estudos acerca de como seleção é capaz de levar a evolução fenotípica foram historicamente simplificados ao considerarem uma relativa constância de $\mathbf{G}$ e $\mathbf{P}$ ao longo do tempo. Ao assumir uma constância de $\mathbf{G}$ ao longo do tempo assume-se que as alterações ambientais responsáveis pelo surgimento de um novo pico adaptativo na paisagem não alteraram tais matrizes diretamente.

Os modelos teóricos da genética quantitativa baseados na matriz $\mathbf{G}$ foram originalmente propostos para tratar de questões de escala temporal microevolutiva, ou seja, que envolvam poucas gerações de uma dada população. Para estudos evolutivos em longa escala temporal, compreender a estabilidade de $\mathbf{G}$ se torna um problema ainda mais difícil de ser solucionado pois não há como obter matrizes genéticas ancestrais reais G_a tampouco a matriz ambiental ancestral E_a . Dessa forma, este é um campo da genética quantitativa e biologia evolutiva que ainda é foco de intenso debate desde a década de 1980. Estudos empíricos são um caminho para compreendermos melhor e expandir as limitações dos modelos teóricos vigentes.

A aplicação dos modelos de genética quantitativa propostos por Lande (1979); Lande and Arnold (1983) pode ser estendida a estudos macroevolutivos, caso algumas haja uma relativa estabilidade das diferenças entre as $\mathbf{G}$ das populações descendentes em torno de uma $\mathbf{G}$ média ($\bar{\mathbf{G}}$) ao longo da diversificação. Neste cenário, a expectativa dos modelos é que haja uma proporcionalidade nas alterações das $\mathbf{G}$ e não que estas permaneçam completamente estáveis e inalteráveis ao longo do tempo evolutivo. Uma forma de investigar a estabilidade dessa $\bar{\mathbf{G}}$ é a partir de dados empíricos que permitam a comparação de matrizes em um contexto filogenético amplo (Steppan et al., 2002). Dada a dificuldade em obter amostras apropriadas para a estimativa de Matrizes $\mathbf{G}$ de populações de mamíferos selvagens, uma maneira de investigar sua constância ao longo do tempo é através da comparação de diversas Matrizes $\mathbf{P}$ ao longo de uma filogenia.

Caso matrizes $\mathbf{P}$ sejam similares podemos retomar a Equação 1.6, e considerar três possíveis hipóteses: **I)** as $\mathbf{G}$ subjacentes também são similares, sendo que $\mathbf{E}$ apresenta efeitos pequenos no fenótipo; **II)** $\mathbf{G}$ não são similares, mas os efeitos de $\mathbf{E}$ atuando em $\mathbf{G}$ levam a $\mathbf{P}$ similares; **III)** tanto $\mathbf{G}$ quanto $\mathbf{E}$ são similares, reforçando os padrões observados em $\mathbf{P}$ (Steiper and Seiffert, 2012).

1.2.4 Crânio de mamíferos como um modelo para estudar evolução

O crânio, em conjunto com a mandíbula, formam um complexo morfofuncional especializado do esqueleto dos mamíferos. Participando desde a obtenção até o início do processamento de alimentos, o crânio também protege os vários tecidos moles que abriga, como o sistema nervoso central e demais
5 órgãos dos sentidos. Nos mamíferos a mandíbula é um osso único e o crânio é composto por 28 ossos (sendo 6 destes os ossículos dos ouvidos) que interagem entre si, com os órgãos que abriga e os demais tecidos que os cercam (Marcucio et al., 2015, 2011).

Historicamente são reconhecidas três principais regiões modulares no crânio com base em suas diferenças de origem, desenvolvimento e função: o neurocrânio, basicrânio e a face. O neurocrânio é
10 uma região ontogeneticamente estável, que cresce principalmente por ossificação endocondral, atingindo a morfologia adulta já em etapas iniciais do desenvolvimento (Cheverud, 1982, 2007b; Farkas et al., 1992). Seu padrão de crescimento segue o desenvolvimento do cérebro, das meninges, do fluido cérebro espinhal e das órbitas. O crescimento do basicrânio também sofre influência do crescimento do cérebro e de fatores de crescimento somático tardios (Moore, 1981). A face, por outro lado, apre-
15 senta desenvolvimento mais tardio, sugerindo que essas regiões tenham controles hormonais distintos (Sara et al., 1981). Ela cresce principalmente por ossificação intramembranosa nas suturas estimulada pelo crescimento dos órgãos acomodados nesta região (Opperman, 2000). Apesar de tais diferenças de origem, de ação dos fatores de crescimento e de efeitos de genes pleiotrópicos, o desenvolvimento das partes do crânio é orquestrado conjuntamente por interações epigenéticas ao longo da morfogê-
20 nese dessas regiões. Dessa forma, o crânio é uma estrutura funcionalmente coerente ao mesmo tempo em que apresenta relativa independência entre as partes que o compõe (Leamy et al., 1999; Wagner, 1996). Além disso, é possível identificar homologias entre os ossos que compõe o crânio das diversas ordens de mamíferos (Atchley, 1993). Padrões comuns consistentes de desenvolvimento foram descritos até mesmo entre linhagens distantes, o que oferece uma ótima oportunidade para realizar estudos
25 comparativos em um contexto evolutivo (Marroig et al., 2009; Porto et al., 2009).

1.2.5 Integração e Modularidade

Os modelos da genética quantitativa formalizaram o conceito de integração, que é de extrema relevância em estudos de biologia evolutiva (Cheverud, 1982, 1984; Lande, 1980b; Lande and Arnold, 1983). Dentro deste modelo teórico, a relação entre os caracteres é descrita conforme seu *padrão mo-*
30 *dular* (como é a distribuição da variação no espaço fenotípico? Ela está dispersa igualmente ou mais concentrada em determinadas direções do morfoespaço?) e sua *magnitude de integração* (que avalia a intensidade da coesão entre caracteres independente do padrão, qual é a magnitude dessa relação?). É importante ressaltar, no entanto, que integração e modularidade não são conceitos completamente distintos. Isso pois a magnitude total de integração entre o conjunto de caracteres afeta diretamente

a detecção de padrões modulares (Porto et al., 2009; Shirai and Marroig, 2010). Integração e modularidade são dois conceitos intimamente relacionados por serem provocados pelos mesmos tipos de interações e processos genéticos, ontogenéticos e populacionais (Cheverud, 1982).

A magnitude de integração morfológica é medida através do coeficiente de determinação r^2 (Cheverud et al., 1989) em matrizes de correlação. Correlações são medidas livres de escala, dessa forma o r^2 pode ser usado para comparar populações de tamanhos variados. As análises de modularidade em matrizes de V/CV são uma forma de investigar módulos variacionais sob a perspectiva de aspectos biológicos como desenvolvimento e função. Nesse contexto, *Módulos* são entidades biológicas (ex. estruturas que exercem determinada função, um processo ou via de desenvolvimento) caracterizadas por um grau de associação interno maior que em relação às demais partes do organismo (Mitteroecker and Bookstein, 2007). Assim sendo, modularidade é um conceito abstrato que busca descrever os diversos níveis e tipos de heterogeneidade encontrados na organização dos organismos (Wagner et al., 2007).

Dessa forma, partir de uma abordagem que considera as consequências da associação entre os caracteres e é essencial para melhor compreendermos a evolução de caracteres complexos. Buscando descrever a relação entre as partes que compõem estruturas complexas e testar hipóteses acerca do relacionamento entre elas, estudos demonstraram que a correlação pode implicar em respostas seletivas correlacionadas e pode limitar ou facilitar a capacidade de resposta adaptativa e influenciar padrões macroevolutivos (Cheverud, 1984; Lande, 1979; Marroig et al., 2009; Pavlicev et al., 2011, 2009a,b; Porto et al., 2009), como ilustrado na Figura 1.2.2. Por isso os aspectos estruturais de **G** são fundamentais para qualquer discussão a respeito da evolução multivariada de caracteres fenotípicos. Além da força da pressão seletiva, a maneira como a variação disponível se relaciona com os regimes de seleção pode restringir ou facilitar os caminhos evolutivos (Marroig and Cheverud, 2005; Marroig et al., 2004).

Dos estudos realizados até o momento com uma ampla representação de táxons de mamíferos, alguns padrões gerais emergem a partir da comparação entre as estruturas de V/CV de matrizes fenotípicas (Cheverud, 1996b; Marroig and Cheverud, 2001; Marroig et al., 2009; Oliveira et al., 2009; Porto et al., 2009):

- I) Existe grande conservação no padrão de correlação de caracteres na maioria dos táxons;
- II) A magnitude de integração, por outro lado, apresenta grande variação, onde mesmo grupos próximos na filogenia apresentam diferenças consideráveis (Oliveira et al., 2009; Porto et al., 2009; Shirai and Marroig, 2010);
- III) A porção de variação explicada pelo primeiro componente principal geralmente é interpretada como tamanho (combinação dos componentes isométrico e alométrico) e pode ser considerado o principal fator afetando a evolução da magnitude de integração (Porto et al., 2009, 2013; Shirai

and Marroig, 2010);

- IV) Quanto maior a porcentagem de variação que pode ser associada a tamanho, maiores são as correlações entre os caracteres. Nesse caso, o aumento dos índices de magnitude de integração torna as estruturas modulares menos evidentes (Porto et al., 2009, 2013; Shirai and Marroig, 2010);
- 5 V) Altos valores de integração entre caracteres cranianos implicam em uma menor capacidade de evoluir na direção da seleção, o que pode ser interpretado como maior restrição, enquanto menores associações entre eles pode proporcionar uma maior flexibilidade evolutiva (Marroig et al., 2009).

1.2.6 Morfologia de Lemuriformes

A anatomia comparativa dos membros da infraordem dos Lemuriformes foi investigada sob diversas perspectivas. Análises morfométricas focaram na caracterização do complexo craniofacial, sendo que a porção mandibular foi mais abordada em estudos fisiológicos e biomecânicos relacionados à mastigação. Os principais trabalhos publicados utilizaram morfometria geométrica para descrever a variação de forma craniana (Viguier, 2002, 2004; Viguier and Tort, 2000). A diversificação da forma craniana e da mandíbula de diversas famílias foi abordada através de análises de superimposição de Procrustes e de Análise de Fourier (decomposição de contorno). Nesta série de trabalhos, a autora investigou quais disparidades entre crânios poderiam estar relacionadas com restrições ambientais ou com a história evolutiva do grupo. Entretanto, devido ao baixo tamanho amostral para diversas famílias, tais trabalhos não são capazes de descrever a quantidade de variação intra-específica nos Strepsirrhini.

Em geral os resultados das análises de morfometria geométrica foram interpretados em termos adaptativos e apontam que: (I) Em membros da família *Indriidae* a diversificação da morfologia craniana foi coordenada principalmente pelo tamanho corporal e das órbitas, enquanto que a mandíbula está fortemente relacionada com dieta (Viguier and Tort, 2000); (II) No gênero *Eulemur* as diferenças morfológicas no crânio aparecem mais orientadas com a distribuição geográfica, mas independente de filogenia (Viguier, 2002); (III) Na família *Cheirogaleidae* há uma forte determinação de especialização funcional (diretamente relacionada com a dieta especializada em gumivoria) e restrições durante o desenvolvimento coordenando a diversificação morfológica, sem efeitos filogenéticos (Viguier, 2004). Além disso, Viguier também considera que existe um elevado grau de homoplasia, resultado de restrições ecológicas comuns que estariam confundindo o efeito de sinal filogenéticos na diversificação morfológica da linhagem.

30 Baab et al. (2014) examinaram como dieta e padrão de atividade teriam moldado a radiação do grupo de primatas de Madagascar. Os autores verificaram que, ao controlar para efeitos de filogenia, apenas dieta foi capaz de explicar a variação na forma craniana de maneira significativa. Os autores discutem que isso pode ser explicado caso ao longo da história evolutiva do clado tenham ocorrido

poucos pontos de alteração de dieta (e possivelmente de tamanho corpóreo) que coincidam com a divergência dos principais clados. De fato, espécies mais aparentadas filogeneticamente apresentam forma, dieta e padrão de atividade mais semelhantes. Entretanto, esse parece ser o padrão encontrado para a maioria dos mamíferos. Outro resultado interessante apontado neste trabalho são análises de Componentes Principais que apontam que o maior eixo de variação (PC1) não foi caracterizado como alometria, mas sim como uma relação entre prognatismo e altura/largura relativa do neurocrânio, enquanto PC2 apontava uma relação alométrica entre tamanho relativo das órbitas e orientação da abóbada em relação a face. 5

A evolução de tamanho foi investigada com mais detalhe por Masters et al. (2014), dando ênfase à família Cheireogalide, que apresenta características pedomórficas. Devido a seu pequeno tamanho corpóreo, essa família é considerada muitas vezes como primitiva. Os autores estimaram a reconstrução do tamanho corpóreo nos primatas de Madagascar utilizando modelos de regressão alométrica com período de gestação e alometria de crescimento e estática. Estes autores avaliaram o papel do nanismo nessa família, testando a hipótese de que o tamanho diminuto seria resultado de progênese (ontogenia truncada). Também avaliaram hipóteses adaptativas relacionando tamanho corporal e aspectos ecológicos. Os autores usaram a família Lepilemuridae como uma aproximação para o ancestral do grupo e chegam a conclusão de que a família Cheirogaleidae apresentou ao menos quatro eventos independentes de redução do tamanho corpóreo via progênese, levando a conclusão de que esta característica do grupo deve ser interpretada como um caráter derivado. Além disso propõem que a dieta baseada em seiva e exsudatos de árvores (gumivoria) teria co-evoluído com a redução do tamanho corpóreo, a partir de um ancestral folívoro de maior tamanho. 10 15 20

1.2.7 A morfologia craniana de lêmures no contexto da ordem Primates

O primeiro trabalho a investigar a morfologia craniana em um contexto mais amplo da diversidade da ordem Primates foi Fleagle et al. (2010). Através de análises de Procrustes e de componentes principais estes autores usaram 18 marcos anatômicos para descrever a forma craniana de 66 gêneros vivos. Suas análises apontam que a diversidade de Strepsirrhini é relativamente menor que os demais Haplorrhini, antropóides, Catarrhini e hominóides. Entretanto, a maior parte da variação dos hominóides pode ser atribuída à presença do gênero *Homo* e ao fato de haver poucos táxons no clado, sendo que quando considerados apenas hominóides não-humanos sua diversidade não se mostra tão acentuada. Na Figura 1.5 apresento uma adaptação das figuras deste trabalho para permitir ao leitor uma visualização do morfoespaço da total diversidade de primatas vivos. No PC1 podemos notar uma clara distinção entre primatas antropóides, não-antropóides, Tarsius e Strepsirrhini. Esse eixo de variação pode ser interpretado tanto num contexto estatístico da análise em questão quanto em relação aos principais eventos cladísticos na evolução dos primatas de separação dos principais clados. Ele 25 30

também apresenta as diferenças de forma mais evidentes distinguindo os grupos de hábito noturno e grandes órbitas dos diurnos, ou características relacionadas à dieta e comprimento do palato.

Apesar de alometria estar correlacionada com ambos PCs representados na [Figura 1.5](#), e ter um papel fundamental em diversas características do crânio de primatas, podemos notar que as mudanças na forma craniana dos principais clados não são apenas uma consequência de escala alométrica. Isso fica mais evidente quando levamos em consideração que muitos dos Platyrrhini (saguís e micos na porção central) apresentam tamanho semelhante a alguns Strepsirrhini (lêmures e lórisés na extrema direita do gráfico). Nessas análises, características da forma craniana como tamanho e orientação das órbitas e flexão do basicrânio sobressaem-se como fatores importantes determinando a distribuição dos grupos no morfoespaço.

Figura 1.5 – Representação dos dois primeiros eixos de variação morfoespaço craniano da diversidade de 66 gêneros da Ordem Primates. Figura adaptada de [Fleagle et al. \(2010\)](#)

Ainda nos resultados obtidos por [Fleagle et al. \(2010\)](#), muitas das diferenças entre os grupos de primatas antropóides não são recapturadas nas análises considerando apenas fêmeas. Isso sugere que a diversidade expressa pelos machos (que ocupam os maiores extremos de PC2) é particularmente distinta. Apesar disso, o padrão geral das análises se mantém quando considerado apenas as fêmeas, indicando que não se trata apenas de um efeito da morfologia dos machos. Por outro lado, é possível notar que os Strepsirrhini apresentam uma diversidade muito mais limitada no PC2, enquanto que nos demais primatas este eixo apresenta grande variação mesmo dentro dos grandes grupos.

Os autores sugerem que o fato do PC2 descrever a maior parte da diversidade de antropóides, mas

uma pequena parte da diversidade em Strepsirrhini pode ser um indicativo de que o acentuado dimorfismo sexual apresentado nos antropóides deve estar baseado em padrões de desenvolvimento similar. Diferentemente dos demais primatas, os lêmures são geralmente monomórficos: machos e fêmeas apresentam tamanho corporal e dentição relativamente semelhantes, sem haver dimorfismo sexual significativo. Em algumas espécies há notável diferença no padrão de coloração da pelagem (especialmente no gênero *Eulemur*). Além disso, existem trabalhos que reportam dimorfismo de grau leve a moderado (quando comparado com aquele presente em demais primatas) em medidas relacionadas a tamanho corpóreo e de dentição, como caninos e premolares. O mais curioso é que em algumas espécies é reportada diferença em tamanho corporal favorecendo fêmeas (Glander et al., 1992; Johnson et al., 2005; Kappeler, 1996; Tennenhouse, 2015).

Com o intuito de ampliar as análises e resultados apresentados por Fleagle et al. (2010) levando em consideração a diversidade morfológica apresentada no registro fóssil, Bennett and Goswami (2012) utilizaram uma metodologia semelhante seguida por análise discriminante em um conjunto de 33 marcos anatômicos de 29 gêneros de Euprimates incluindo 5 gêneros extintos. Seus resultados indicam que, mesmo com a inclusão dos subfósseis lêmures, os Strepsirrhini apresentam uma menor diversidade que os antropóides. Segundo eles tal disparidade não seria apenas um artefato das extinções de megafauna recentes de Madagascar. Entretanto, a interpretação desses resultados deve ser feita com cautela, uma vez que a amostragem de Bennett and Goswami (2012) tem representação mais reduzida da diversidade do clado que a de Fleagle et al. (2010), e considerou apenas 5 gêneros de lêmures viventes.

1.3 Objetivos, Perguntas e Hipóteses

A matriz **G** é a personagem central nas análises de predições dos modelos da genética quantitativa. Entretanto, a estabilidade da matriz **G** ao longo do tempo evolutivo é foco de intenso debate desde os anos 1980. Esse estudo empírico se insere no contexto da genética quantitativa comparativa e pretende contribuir com o avanço do entendimento deste fenômeno. Uma relativa estabilidade de **G** é um dos pressupostos necessários para a aplicação dos modelos microevolutivos da genética quantitativa à estudos que envolvam estimativas de gradientes de seleção ou de matrizes ancestrais. Portanto, avaliar a estabilidade de **G** nos Strepsirrhini deve ser o primeiro passo para a aplicação das matrizes obtidas aos modelos de genética quantitativa em uma perspectiva multivariada para investigar a evolução morfológica desta linhagem (proposta do capítulo seguinte).

Capítulo 1: Genética quantitativa comparativa

Objetivo *Avaliar a evolução dos padrões de variância e covariância na linhagem dos primatas Strepsirrhini.*

Pergunta *A estrutura de variação genética dos caracteres cranianos observada nas espécies de primatas Strepsirrhini se manteve estável ao longo da diversificação da linhagem?*

Expectativa *A estrutura de variação fenotípica observada nos caracteres cranianos é similar entre as espécies de primatas da subordem Strepsirrhini.*

Alternativa *Diferenças no padrão observado entre os taxa podem ser atribuídas, ao menos em parte, a alterações nos regimes de seleção ao longo da história do grupo.*

Podemos investigar a estabilidade da estrutura de variância aditiva (representada em **G**) ao longo da diversificação de um clado através da comparação dos padrões de associação observados em um conjunto de caracteres fenotípicos complexo (representado em **P**) numa escala filogenética ampla. Resultados de estudos prévios com os demais membros da ordem dos primatas relatam relativa constância nos padrões de variância fenotípica entre os caracteres do crânio, o que nos leva a expectativa de estabilidade para o clado dos Strepsirrhini. A matriz **P** representa a somatória dos efeitos aditivos genéticos (Matriz **G**) e demais fontes de covariância genética interagindo com fatores ambientais (Matriz **E**) por meio de processos de desenvolvimento. O relacionamento entre **P**, **G** e **E** deve ser interpretado de acordo com o modelo de mapa genótipo/fenótipo. De acordo com este modelo, a variação morfológica está sujeita a limitações impostas por múltiplas restrições de desenvolvimento e função.

Ainda que haja diferença considerável nos efeitos ambientais particulares a cada táxon, estes devem atuar nas mesmas vias de desenvolvimento das respectivas **G**, de forma que os táxons estariam sujeitos a restrições comuns. Dessa forma, esperamos encontrar considerável grau de similaridade na estrutura de variação fenotípica observada nas espécies. Também devido ao fato de os padrões de variação ambientais atuarem sob as vias de desenvolvimento, os padrões contidos em **G** são espelhados em sua porção fenotípica (a chamada conjectura de Cheverud).

Capítulo 2: Teste de Deriva genética

Objetivo *Avaliar se a diversificação dos primatas Strepsirrhini se deu por processos estocásticos ou por ação de seleção natural.*

Pergunta *A divergência observada entre os táxons está dentro da expectativa de deriva genética?*

Expectativa *O total de variação observada entre as médias multivariadas dos táxons de primatas Strepsirrhini atuais é proporcional ao total de variação estimado para seu ancestral.*

Alternativa *Desvios de proporcionalidade podem ser atribuídos à ação de processos como seleção direcional ou seleção estabilizadora.*

Os modelos da genética quantitativa elaborados por Lande (1979, 1980b) apresentam a expectativa de *proporcionalidade* entre o padrão observado na divergência fenotípica entre táxons (representado pela matriz **B**) e a estrutura de variação disponível na população ancestral (matriz G_a) quando deriva genética é o único processo atuando. Caso haja relativa estabilidade na estrutura das **G**, essa matriz ancestral pode ser estimada como a média ponderada entre as matrizes **P** das populações descendentes de acordo com sua relação filogenética (matriz **W**). Nesse caso, proporcionalidade refere-se a manutenção da quantidade de variação associada a cada eixo de variação e do alinhamento entre eles do alinhamento dos um deles.

1.4 Metodologia

Optei por destinar alguns parágrafos da introdução geral à descrição detalhada da metodologia utilizada ao longo deste projeto por dois motivos. Primeiramente, entendo o material final da dissertação como um documento cujo conteúdo deve abarcar de maneira completa o assunto específico em que o estudo se insere, visando a melhor acessibilidade para novos leitores à esta área do conhecimento. Segundo, o intuito das publicações advindas deste projeto de mestrado não será propor inovações metodológicas, mas sim investigar de maneira mais aprofundada a estrutura multivariada de divergência fenotípica entre clados de Strepsirrhini. Assim sendo, existe um grau de detalhamento metodológico que não convém ser abordado dentro dos capítulos a seguir. Dessa forma, para satisfazer o modelo tradicional de dissertação, na sessão seguinte encontram-se detalhadas particularidades metodológicas relevantes, enquanto que ao longo dos capítulos a metodologia será mais concisa e devidamente referenciada.

1.4.1 Identificação

Ao longo dos anos 1970 até o final da década de 1980, a relação taxonômica entre membros da subordem dos Strepsirrhini era determinada a partir de análises de caracteres morfológicos. Nesse período vários trabalhos se dedicaram a reexaminar os caracteres morfológicos dos Lemuriformes buscando por apomorfias e diferenças consistentes entre eles que pudessem contar sua história evolutiva (Carmill, 1975; Groves, 1974; Groves and Trueman, 1995; Groves and Eaglen, 1988; Schwartz and Tattersall, 1985; Szalay and Katz, 1973; Szalay et al., 1987; Tattersall and Schwartz, 1974, 1975, 1991).

Apesar do clado dos Lemuriformes ser bastante robusto, tanto por análises morfológicas quanto moleculares (Yoder, 2012), não há um caráter morfológico que possa ser considerado como sinapomorfia (Yoder, 1997). Principalmente Lemuridae, a família mais diversa em número de gêneros, foi

foco de intenso escrutínio sistemático (mais detalhes na revisão de Yoder and Irwin, 1999). Com isso, existe uma literatura vasta que me permitiu investigar os caracteres morfológicos cranianos afim de identificar as amostras dessa família ao nível de espécie.

No decorrer das últimas duas décadas o número de espécies de Lemuriformes reconhecidas triplicou (chegando a uma centena Mittermeier et al., 2010), sendo que muitas delas apresentam diversidade críptica ou tratam-se de subespécies (Groves, 2001; Nekaris and Bearder, 2007; Radespiel et al., 2008; Tattersall, 2007; Yoder, 2012). Esses números refletem a recente explosão de trabalhos de campo e estão potencialmente relacionados a fins de conservação, mas também conduziram a uma inflação taxonômica (Tattersall, 2007).

A identificação até nível de gênero, entretanto, é bastante clara para todo o clado dos Strepsirrhini. Usei como principais referências Schwartz and Tattersall (1987); Tattersall and Schwartz (1974, 1975) para a identificação de espécies da família Lemuroidea e Groves and Helgen (2007) para as espécies do gênero *Propithecus*. As identificações até o nível de espécie puderam ser realizadas com facilidade dependendo do nível de preservação dos crânio, das peles (quando presente) e da manutenção das respectivas etiquetas de coleta ou contendo as informações originais de localidade.

Quando as peles puderam ser devidamente associadas aos crânios, muitos dos conflitos e até mesmo erros de identificação puderam ser solucionados, sendo que estes foram reportados às coleções. Por exemplo, no escrutínio entre espécimens de *Lemur catta* dos gêneros *Eulemur* e *Varecia*, que apresentam morfologias cranianas bastante semelhantes, mas padrão de coloração da pelagem bastante diferentes, fui capaz de estabelecer com maior confiança a determinação de cada gênero e espécie. Na presença das peles foi possível distinguir até mesmo entre sexos do gênero *Eulemur*, uma vez que há dimorfismo sexual acentuado nos padrões de coloração da pelagem dos sexos deste gênero.

Nos casos dos gêneros *Hapalemur*, *Avahi*, *Microcebus* e *Chereogaleus* houve dificuldades para a identificação até o nível de espécie pois o padrão de coloração destes gêneros é uma variação de tonalidades de marrom e cinza. Por se tratarem de espécies bastante ameaçadas de extinção, a maioria dos espécimes foi coletado antes da década de 1950. Dessa forma, mesmo quando peles estavam presentes, devido ao efeito do tempo e consequente desbotamento das peles, optei por utilizar as informações de localidade e caracteres morfológicos cranianos como prioritários para discernir entre as espécies.

Ao longo da etapa de coleta de dados morfológicos em coleções revi a identificação taxonômica de todos os espécimens acessados. Esta tarefa foi padronizada mantendo como principal referência para a distribuição das espécies a edição mais atual do guia de campo para identificação de Mittermeier et al. (2010). Essa edição contém informação detalhada e atualizada para a distribuição atual e coloração de todas as espécies de primatas de Madagascar.

Vale ressaltar que Madagascar foi bastante degradada durante os últimos anos, especialmente devido à ação e ocupação humanas. Dessa forma, utilizei o guia online da terceira edição do Wilson and

1.4 Metodologia

Reeder (2005), disponível online no [Mammal Species of the World](http://www.departments.bucknell.edu/biology/resources/msw3/browse.asp?id=12100002)⁴ para buscar a localização de espécies tipo, e acessei mapas antigos disponíveis na [David Rumsey Map Collection](http://rumsey.mapranksearch.com/)⁵ para acompanhar as alterações de nomenclatura de cidades e demais unidades geográficas na ampla janela temporal entre todos os materiais acessados (o espécime mais antigo medido foi coletado em 1865 por Pollen & Van Dam – expedição à Madagascar entre 1860-1870).

5

Para os espécimes representante do gênero *Galago* selecionei amostras de localidades restritas à distribuição reconhecida para para a espécie *G. senegalensis*. Todos os espécimens dessa espécie foram medidos na coleção do National Museum of Natural History – Smithsonian, e continham informação de distribuição dentro de Burkina Faso, país onde apenas esta espécie ocorre (Ginn and Nekaris, 2014; Mittermeier and Rylands, 2013).

10

1.4.2 Filogenia

Para este estudo será considerada a filogenia de Herrera and Davalos (2016) Figura 1.6, inferida através de evidência-total de tempo de divergência por *Tip-dating* e *Fossilized Birth-Death Process*. Os dados da matriz concatenada para a comparação de modelos de relógio molecular relaxado foram feitos por *Stepping-stone* e se baseiam num conjunto de dados molecular (com 2 mtDNA, 4 nDNA coding loci, 5767 base-pairs de 114 taxa viventes e 8 extintos) e morfológico (370 caracteres qualitativos cranianos, dentários, pós-cranianos, tecidos moles e caracteres fisiológicos de 85 taxa viventes e 33 extintos com distribuição independente). Como podemos ver pela filogenia apresentada, a diversificação no nível de família se deu em torno de 30-20 Ma, dos gêneros entre 15 e 10 Ma e no nível de espécie desde 15 a 2 Ma.

20

Visando explorar a totalidade da diversidade morfológica nos gêneros de primatas e dando continuidade aos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Evolução de Mamíferos (LEM) do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da USP (eg. de Oliveira et al. (2009); Marroig and Cheverud (2001)), optei por incluir os representantes do gênero *Tarsius* nas análises desta dissertação.

⁴<http://www.departments.bucknell.edu/biology/resources/msw3/browse.asp?id=12100002>

⁵<http://rumsey.mapranksearch.com/>

Figura 1.6 – A filogenia dos Strepsirrhini utilizada neste estudo foi elaborada por [Herrera and Davalos \(2016\)](#) é a mais recente e completa e para o clado.

1.4.3 Coleta de dados

Landmarks Este estudo foi baseado na coleta de um conjunto de 22 marcos geométricos determinado em trabalhos anteriores (Cheverud, 1982, 1995, 1996b; Marroig and Cheverud, 2001; Marroig et al., 2009; Porto et al., 2009), de forma que podem integrar o restante da base de dados do LEM. Os marcos geométricos utilizados localizam-se na justaposição de suturas entre dois ou três ossos ou em caracteres discretos (*por exemplo, OPI limite dorsal do foramen magno*). Todos os marcos utilizados são homólogos de forma a manter correspondência biológica entre os espécimes medidos (Sneath and Sokal, 1973)). Sua determinação se baseou em estudos detalhados acerca da anatomia craniana do grupo (Schwartz and Tattersall, 1987; Tattersall and Schwartz, 1974, 1975). Além desse conjunto padrão de marcos anatômicos, incluí sete novos marcos a serem utilizados em análises futuras por serem capazes de descrever de maneira mais detalhada a região das órbitas. A descrição de cada marco pode ser encontrada na Tabela 1.4.3 e as respectivas localizações no crânio podem ser verificados na Figura 1.4.3.

A partir desses marcos anatômicos calculei 39 distâncias lineares entre marcos que representam distâncias contidas em ossos individuais. Dessa forma consideramos que tais distâncias representam processos locais de desenvolvimento e função que, em conjunto, descrevem esta estrutura como um todo (Cheverud, 1982, 1995), evitando redundâncias. Na Tabela 1.4.3 são expostas as hipóteses modulares em cinco agrupamentos funcionais e duas unidades de desenvolvimento (*sensu* Cheverud (1995)). Visando controlar possíveis efeitos ontogenéticos sobre a estimativa de matrizes de correlação fenotípicas foram considerados apenas indivíduos adultos, com erupção completa e funcional da dentição, além de sincronose basioccipital completa (Mitteroecker and Bookstein, 2009).

Digitalização As coordenadas dos marcos anatômicos foram coletadas utilizando um braço digitalizador *Microscribe MX* (Immersion Corporation, San Jose, California). Para marcos anatômicos bilaterais (presentes em ambos os lados do crânio) ambos os lados foram registrados. Indivíduos foram medidos duas vezes independentemente, de modo a estimar o erro associado ao processo de medição através do cálculo da repetibilidade (Falconer and Mackay, 1996; Lessells and Boag, 1987). As coordenadas 3D de cada marco anatômico foram armazenadas em planilhas de Excel e a partir delas foram calculadas as distâncias euclidianas informadas na Tabela 1.4.3. Medidas compostas por ao menos um marco bilateral foram consideradas como a média das distâncias calculadas em cada lado, sendo que no caso de exemplares danificados em um dos lados, a distância naquele preservado foi considerada como a média.

Tabela 1.1 – Descrição dos 27 marcos anatômicos (Landmarks) utilizados neste estudo. Em itálico estão aqueles posicionados sobre a linha sagital e são, portanto, únicos em cada exemplar. Os demais são encontrados em ambos lados do crânio. Os asteriscos indicam novos Landmarks incorporados durante a coleta de dados que servirão em análises futuras por melhor descreverem a estrutura das órbitas.

Landmarks	Descrição
<i>IS</i>	<i>interincisivo superior</i>
<i>PM</i>	<i>sutura maxilar-premaxilar em porção lateral</i>
<i>NSL</i>	<i>extremidade rostral do nasal</i>
<i>ZS</i>	<i>sutura superior entre o zigomático e o maxilar</i>
<i>ZI</i>	<i>sutura inferior entre o zigomático e o maxilar</i>
<i>NA</i>	<i>extremidade caudal do nasal na junção com o frontal</i>
<i>PT</i>	<i>sutura entre o parietal e o frontal em posição lateral</i>
<i>PNS</i>	<i>extremidade caudal da sutura entre os palatinos</i>
<i>TSP</i>	<i>sutura entre os ossos temporal, esfenóide e frontal</i>
<i>MT</i>	<i>tuberosidade maxilar caudal ao terceiro molar</i>
<i>BA</i>	<i>ponto ventral mediano do forame magno</i>
<i>TS</i>	<i>sutura entre o temporal e o esfenóide em posição caudal</i>
<i>OPI</i>	<i>ponto dorsal mediano do forame magno</i>
<i>JP</i>	<i>processo jugular</i>
<i>BR</i>	<i>sutura entre o parietal e o frontal em posição medial</i>
<i>EAM</i>	<i>meato auditivo externo rostral, sutura com o temporal</i>
<i>LD</i>	<i>sutura entre o occipital e o interparietal em posição medial</i>
<i>PEAM</i>	<i>meato auditivo externo caudal</i>
<i>AS</i>	<i>sutura entre os ossos parietal e occipital</i>
<i>FM</i>	<i>sutura entre o zigomático e frontal em posição anterior</i>
<i>ZYGO</i>	<i>sutura entre o zigomático e o temporal</i>
<i>APET</i>	<i>ponto anterior da crista petrosal</i>
<i>*LA</i>	<i>sutura entre o lacrimal e frontal proxima a margem da órbita</i>
<i>*OC</i>	<i>canal óptico superior</i>
<i>*ON</i>	<i>canal óptico inferior</i>
<i>*PA</i>	<i>extremidade caudal do palatino</i>
<i>*FT</i>	<i>sutura entre o zigomático e frontal em posição caudal</i>
<i>*IN</i>	<i>Ínion, extremidade caudal do occipital em posição central</i>

Figura 1.7 – Localização das *Landmarks* deste estudo mostradas sobre o crânio de um espécime de *Indri indri*, em vistas ventral, dorsal, lateral e mandíbula esquerda em vista lateral.

Tabela 1.2 – Trinta e nove caracteres cranianos: medidas lineares (distâncias euclidianas calculadas a partir dos marcos) e sua classificação em cinco grupos funcionais e duas regiões de desenvolvimento.

Distância	Região	Hipótese
IS.PM	Face	Oral
IS.NSL	Face	Nasal
IS.PNS	Face	Oral, Nasal
PM.ZS	Face	Oral
PM.ZI	Face	Oral
PM.MT	Face	Oral
NSL.NA	Face	Nasal
NSL.ZS	Face	Nasal
NSL.ZI	Face	Oral, Nasal
NA.BR	Neurocrânio	Abóbada
NA.FM	Face	Orbita
NA.PNS	Face	Nasal
BR.PT	Neurocrânio	Abóbada
BR.APET	Neurocrânio	Abóbada
PT.FM	Neurocrânio	Órbita
PT.APET	Neurocrânio	Abóbada
PT.BA	Neurocrânio	Abóbada
PT.EAM	Neurocrânio	Abóbada
PT.ZYGO	Face	Zigomático
PT.TSP	Face, Neurocrânio	Zigomático, Abóbada
FM.ZS	Face	Orbita
FM.MT	Face	Orbita
ZS.ZI	Face	Oral
ZI.MT	Face	Oral
ZI.ZYGO	Face	Zigomático
ZI.TSP	Face	Zigomático
MT.PNS	Face	Oral
PNS.APET	Neurocrânio	Base
APET.BA	Neurocrânio	Base
APET.TS	Neurocrânio	Base
BA.EAM	Neurocrânio	Base
EAM.ZYGO	Face	Zigomático
ZYGO.TSP	Face	Zigomático
LD.AS	Neurocrânio	Abóbada
BR.LD	Neurocrânio	Abóbada
OPI.LD	Neurocrânio	Abóbada
PT.AS	Neurocrânio	Abóbada
JP.AS	Neurocrânio	Base
BAO.PI	Neurocrânio	Base

Repetibilidade das medidas Medi crânios de indivíduos da mesma espécie duas vezes para obter uma estimativa do erro associado ao processo de mensuração. De acordo com [Lessells and Boag \(1987\)](#) a repetibilidade é calculada como:

$$r = s_E^2 / (s_D^2 + s_E^2) \quad (1.7)$$

Essa métrica deve ser interpretada como uma razão entre a quantidade de variação entre indivíduos s_E^2 e o total de variação observado (somatória da quantidade entre e dentro das amostras individuais

5

s_D^2). Ela é a porcentagem da variação total das medidas que pode ser atribuída à diferença entre os espécimens e não à diferença entre as réplicas. Dessa forma, quanto maior o valor encontrado para esta estatística, podemos inferir que a maior parte da variação observada pode ser explicada pela variação entre os indivíduos daquele grupo, e não a erros de mensuração (ex. grandes diferenças entre as
5 réplicas individuais).

Dado que cada indivíduo apresenta dois valores de medida para cada uma das distâncias de interesse, o cálculo da repetibilidade é realizado através de uma ANOVA simples, usando a informação de indivíduo como variável independente e suas respectivas réplicas como variável dependente. A partir disso, os quadrados médios da análise de variância são usados para determinar a proporção de varia-
10 ção dentro dos grupos ($s^2 = MS_w$), e obter a entre os grupos, onde n_0 representa o tamanho amostral (nesse caso, o número de réplicas = 2):

$$s_E^2 = (MS_E - MS_D) / n_0 \quad (1.8)$$

1.4.4 Estimativa de Matrizes de V/CV

Neste projeto me vali de matrizes de caracteres cranianos durante as análises de evolução fenotípica acompanhadas do par de matrizes **G** e **P** de *Saguinus fuscicollis* estimada por [Cheverud \(1996b\)](#) para
15 verificar a estabilidade de tais matrizes em um contexto filogenético mais amplo.

Controle para efeitos fixos Nos sistemas naturais podem existir diferenças significativas entre categorias de uma população que sejam importante fonte de variação intra-específica atuando ao longo da evolução. Entretanto, espera-se que a maior parte da arquitetura genética subjacente aos indivíduos dessa população seja compartilhada. Dessa forma, ignorar fontes de variação desse tipo (por exemplo
20 diferença média entre sexos ou localidades) pode obscurecer o padrão de variação determinado pela arquitetura genética. Dado que o intuito deste estudo não é investigar as diferenças entre machos e fêmeas, antes de estimar matrizes fenotípicas de espécie verifiquei se há alguma diferença significativa que seja atribuída a esse efeito fixo.

Esse pressuposto de que a arquitetura genética inerente aos indivíduos é em sua maior parte com-
25 partilhada é testado através de uma MANOVA (análise multivariada, baseada na estatística λ de Wilks) e soma-de-quadrados do tipo III, usando os valores das médias entre as réplicas individuais para cada caráter como variáveis dependentes e as categorias do efeito sob investigação como variáveis independentes. Caso o efeito do fator sexo seja significativo ele deve ser corrigido através desse modelo linear ([Marroig and Cheverud, 2001](#)). Em casos de efeitos significativos ($p < 0,05$) os resíduos do modelo deve
30 ser utilizado na estimativa de matrizes de V/CV fenotípicas. Vale ressaltar que para a correção de efeitos fixos, apenas indivíduos devidamente categorizados entram no modelo de modo que indivíduos

com informação faltante não são contabilizados na estimativa da matriz. Isso pode ser verificado através do valor de graus de liberdades associado aos resíduos do modelo. Quando for necessário estimar matrizes a partir dos resíduos dos modelos isso deve ser considerado, uma vez que matrizes V/CV bem estimadas deve ter um mínimo de tamanho amostral igual ao número de dimensões (caracteres).

Este mesmo raciocínio pode ser estendido para a presença de demais efeitos fixos (ex. localidade, subespécie), bem como interações entre eles. Devido a ausência de informação ou de precisão de localidade para alguns espécimes acessados, efeitos de geografia não podem ser levado em consideração. Para as matrizes de espécie apenas o fator sexo foi testado, enquanto que nas matrizes de gênero foi levado em consideração o efeito de espécie e dos respectivos tamanhos amostrais. Neste estudo, o efeito de sexo foi significativo apenas em uma espécie e todas as matrizes foram estimadas diretamente através dos dados brutos. Maiores detalhes na [Página 43](#).

A grande maioria dos primatas de Madagascar não apresenta dimorfismo sexual em relação a tamanho ([Fleagle et al., 2010](#)), mas em alguns casos existe dicromatismo entre os sexos que apresentam variação no padrão de coloração da pelagem ([Mittermeier et al., 2010](#)) ou em caracteres do esqueleto pós-craniano como comprimento dos membros inferiores e alguns caracteres de dentição ([Kappeler and Schaffler, 2008](#)). Dessa forma, desde o princípio não esperávamos encontrar sexo como um fator significativo. Além disso, existe pouquíssima sobreposição geográfica entre as espécies (simpatria), de forma que as matrizes de gênero poderiam ser estimadas utilizando o critério de espécie ou de localidade como fator significativo para gerar este modelo.

Repetibilidade das Matrizes As métricas de repetibilidade de matrizes são uma forma de avaliar o efeito do tamanho amostral do conjunto de dados utilizados na estimativa da matriz e sua capacidade de representar de maneira fidedigna a estrutura de variação presente na população original. O valor máximo teórico de correlação entre duas matrizes não é igual a 1, mas sim igual à média geométrica entre as repetibilidades das duas matrizes sob comparação. A medida de repetibilidade das matrizes limita o valor máximo da correlação entre pares de matrizes sob comparação. O valor de correlação corrigida r_r para matrizes de correlação, segundo [Cheverud \(1996b\)](#) pode ser obtido através de:

$$r_r = \frac{r_o}{\sqrt{t_A t_B}} \quad (1.9)$$

onde r_o é o valor de correlação encontrado para duas matrizes **A** e **B** e t_A e t_B seus respectivos valores de repetibilidade.

Matrizes de Covariância No caso de matrizes de covariância, a repetibilidade é calculada usando dois procedimentos principais: *bootstrap* ([Oliveira et al., 2009](#); [Porto et al., 2009](#)) e por métodos de

Monte Carlo (Melo et al., 2015). Ambas partem da amostra original utilizada para a estimativa da matriz (dados brutos ou resíduos do modelo linear ajustado para fatores cujo efeito não tenha interesse para a estrutura geral da matriz).

No método de *bootstrap* são feitos sorteios com reposição, de forma a manter o tamanho amostral n igual ao da amostra original. A partir dessas reamostragens estima-se uma nova matriz que é comparada à original através de um dos métodos de comparação de matrizes (mais detalhes na Subseção 1.4.5), utilizando o mesmo a ser empregado para a comparação da matriz em questão com as demais. Esse procedimento é repetido mil vezes e o valor de repetibilidade associado à matriz em questão é a média das correlações entre a matriz original e cada uma de suas réplicas obtidas por *bootstrap*.

No método por *Monte Carlo* a própria matriz original é usada como o parâmetro σ da distribuição multivariada normal para gerar um conjunto de observações de mesmo tamanho que o tamanho amostral da matriz original. A partir desse novo conjunto de dados gerados é calculada a matriz de variância ou de correlação, que é então comparada à matriz original (Melo et al., 2015). O valor de repetibilidade por MC é reportado como o valor médio de comparação entre a matriz original e as séries de matrizes geradas.

1.4.5 Comparação de matrizes: estrutura e padrão de V/CV

A partir das matrizes estimadas e de suas respectivas repetibilidades, as comparações entre as matrizes **P** foram realizadas através dos métodos de *Random Skewers* (Cheverud, 1996b; Cheverud and Marroig, 2007) e *projeção de Krzanowski* (Krzanowski, 1979).

Random Skewers (RS) É a aplicação direta da equação de resposta multivariada à seleção (Equação 1.5) de Lande (1979). Este método consiste em gerar um grande número de vetores aleatórios de seleção (β) e comparar os valores das respectivas respostas evolutivas (Δz) de cada matriz (**A** e **B**) através da correlação entre seus vetores resposta (Cheverud, 1996b; Cheverud and Marroig, 2007; Marroig and Cheverud, 2001), que é medida como o cosseno do ângulo entre esses dois vetores. Dessa forma, para um vetor β_1 aleatório temos:

$$RS_1(\mathbf{A}, \mathbf{B}) = \cos(\mathbf{A}\beta_1, \mathbf{B}\beta_1) \quad (1.10)$$

Este procedimento é repetido dez mil vezes, sendo que o valor de RS reportado é a média entre os mil resultados. Qualquer diferença detectada nesse método pode ser atribuída a diferenças entre as matrizes, uma vez que ambas foram submetidas ao mesmo conjunto de gradientes de seleção. A significância do valor médio de correlação encontrado para cada par de vetor resposta (Δz para cada matriz) é ve-

rificada a partir de uma distribuição nula gerada a partir de correlações entre vetores aleatórios (Melo et al., 2015). Nesse método a hipótese nula de que as matrizes são diferentes é testada verificando o valor de correlação média entre os pares de vetores resposta. Caso este valor esteja acima do intervalo de 95% dos valores de correlação entre vetores aleatórios, aceita-se a hipótese alternativa de que as matrizes são similares. Os valores de similaridade por RS, então são diretamente interpretados como o potencial de cada matriz responder de maneira alinhada à seleção direcional. Portanto, é uma métrica extremamente útil e direta para avaliar a manutenção de G e P ao longo do tempo.

Krzanowski (KRZ) Chamado de espaço compartilhado, o método de projeção de Krzanowski permite correlacionar matrizes através do cálculo do ângulo entre seus pares de componentes principais. Os componentes principais (PCs ou autovetores) são ortogonais em matrizes de variância e covariância e representam suas direções de variação. O método de KRZ se baseia no subespaço capturado pela primeira metade de PCs (*i.e.* metade de dimensões menos um), onde encontra-se a maior parte da variação das matrizes. A partir desse subespaço é avaliado o quanto da orientação é compartilhada entre o par de matrizes em questão (Blows et al., 2004; Krzanowski, 1979). Este método permite avaliar a similaridade da estrutura deste subespaço de pares de matrizes (Marroig and Cheverud, 2010) através de **S**, a matriz de projeção obtida pela relação:

$$\mathbf{S} = \mathbf{A}^T \mathbf{B} \mathbf{B}^T \mathbf{A} \quad (1.11)$$

onde **A** e **B** correspondem à primeira metade dos respectivos PCs normalizados do par de matrizes sob comparação e T indica a operação de transposição. Em **S** encontram-se os cossenos dos ângulos mínimos entre um conjunto de vetores ortogonais arbitrários no subespaço de **A** que mais se aproximam da orientação de outro conjunto de vetores ortogonais no espaço de **B**. Os autovalores de **S** estão entre 0 e 1, indicando direções completamente dissimilares e idênticos, respectivamente.

Estes autovalores são utilizados para obter o índice de similaridade entre os dois subespaços das matrizes comparadas. O somatório dos autovalores de **S** equivale à soma dos quadrados dos cossenos entre os dois conjuntos de vetores ortogonais. Esse somatório representa uma medida conveniente da similaridade compartilhada pelas duas matrizes pois pode ser interpretado diretamente como o número de PCs dessas matrizes que compartilham uma mesma orientação (Blows et al., 2004; Krzanowski, 1979; Marroig and Cheverud, 2010).

SRD O método desenvolvido em Marroig et al. (2011) propõe uma maneira de investigar as possíveis diferenças estruturais nas matrizes de V/CV. Através do método de decomposição da resposta à seleção (SRD, da sigla em inglês), podemos separar o vetor de resposta à seleção δz em seus componentes

específicos referentes à resposta direta atuando sobre cada caráter em particular. Através do método de *Random Skewers* o par de matriz em questão é submetido a um conjunto de vetores simulados, gerando um valor médio de comparações e de desvios. Neste método é avaliada a relação entre os desvios em torno da média de comparações em relação ao valor global de comparação (μDev) e o desvio dos desvios padrões das mesmas (σDev). Seu resultado deve ser interpretado considerando que, assim como no método de RS, o valor médio das simulações de resposta à seleção representa correlação entre vetores. Dessa forma, valores superiores a 0.9 são considerados extremamente altos, entre 0.7 e 0.9 altos, entre 0.4 e 0.7 moderados e inferiores a 0.4 baixos.

1.4.6 Comparação de matrizes: estatísticas evolutivas

Além de investigar as diferenças estruturais no padrão das matrizes fenotípicas de V/CV através dos métodos de comparação de matrizes, existem algumas estatísticas que nos permitem avaliar aspectos de interesse biológico. Quando dizemos que as matrizes apresentam determinada estrutura reconhecemos que as correlações entre os caracteres que a compõe são não-nulas. Tal estrutura impõem restrições às mudanças evolutivas (Arnold et al., 2001; Marroig et al., 2009). Num contexto evolutivo, as matrizes foram avaliadas segundo a teoria de integração morfológica e modularidade (Cheverud, 1996b; Olson and Miller, 1958; Wagner, 1996), da equação de resposta multivariada à seleção (Lande, 1979), do conceito da paisagem adaptativa (Arnold et al., 2001; Lande, 1979; Simpson, 1944; Wright, 1932) e do conceito de linhas de menor resistência evolutiva (Schluter, 1996).

Magnitude de integração r^2 Essa métrica diz respeito ao total de associação entre os caracteres. A magnitude de integração é calculada como a média do quadrado das correlações dos caracteres. Por ser obtida a partir da matriz de correlação, essa métrica é independente de escala, o que a torna particularmente favorável à comparação de taxa cujas medidas apresentam acentuada diferença em tamanho (Cheverud et al., 1989; Oliveira et al., 2009; Porto et al., 2009). Para testar estatisticamente sua semelhança/diferença, intervalos de confiança são gerados a partir de método de Monte Carlo, utilizando as matrizes originais como parâmetro para simular distribuições multivariadas.

% PC1 Matrizes de V/CV são definidas a partir de dois parâmetros: as direções, ou eixos, de variação e a quantidade de variação em cada uma destas direções. Essas direções de variação são os Componentes Principais (PC⁶) A quantidade de variação associada ao primeiro componente principal (eixo em que há maior disponibilidade de variação, também chamado de linha de menor resistência evolutiva) refere-se a razão associada a este componente e o traço da matriz (soma das variâncias na diagonal principal).

⁶manteremos com a abreviação do inglês *Principal Components*

1.4.7 Efeito de processos evolutivos

A teoria da genética quantitativa apresenta algumas expectativas a respeito da divergência morfológica em grupos monofiléticos (que compartilham um ancestral comum). Essas expectativas podem ser investigadas a partir da comparação dos padrões de variância e covariância observados entre as médias de populações atuais em relação àquela na população ancestral. 5

De acordo com os modelos apresentados por Lande (1979), o total de divergência morfológica apresentado entre as médias de grupos descendentes de um ancestral comum ($\mathbf{B}_t$) é uma função da estrutura de variância e covariância genética aditiva apresentada na população ancestral ($\mathbf{G}_a$) e da razão entre tempo decorrido t (em número de gerações) e tamanho efetivo populacional N_e .

$$\mathbf{B}_t = \mathbf{G}_a(t/N_e) \quad (1.12)$$

Assumindo que para cada comparação particular a razão t/N_e se mantém constante, podemos abordar a hipótese de deriva genética como explicação suficiente para a divergência morfológica observada ao testar a proporcionalidade entre a variação na divergência entre as médias dos grupos descendentes e aquela apresentada no ancestral. 10

Como ressaltado anteriormente na Subsubseção 1.4.4, ao longo deste estudo foram utilizadas matrizes fenotípicas, sendo que a matriz dos nós ancestrais da filogenia serão obtidas a partir de uma média ponderada das matrizes dos táxons descendentes ($\mathbf{W}$), considerando a topologia de suas relações filogenéticas. Dessa forma, a proporcionalidade testada é entre $\mathbf{B}$ e $\mathbf{W}$. 15

Essa proporcionalidade pode ser abordada através de uma simplificação matemática em que as matrizes de variância e covariância passam a ser descritas por seus PCs. Esses componentes são vetores que descrevem distribuição da variação nas direções do morfo-espço da matriz e são organizados em ordem decrescente, de acordo com suas quantidades de variação respectivas. Além disso, os eixos de variação descritos pelos PCs são ortogonais em matrizes simétricas, ou seja, são não-correlacionados entre si. Dessa forma, na escala dos componentes principais, a matriz de variância e covariância é uma matriz diagonal (*e.g.* sem covariância entre os elementos) onde cada elemento da diagonal representa a quantidade de variação associada aos PCs (seus autovalores). 20

Ao multiplicarmos os k caracteres das médias de n populações $\mathbf{X}$ pela matriz de PCs estandardizada $\mathbf{E}$ (onde a soma dos quadrados dos elementos de cada PCs resulta em 1), obtemos as projeções de cada uma das populações nos componentes principais $\mathbf{Y}$ (procedimento chamado de projeção das médias das populações no espaço dos componentes principais de $\mathbf{W}$): 25

$$Y_{n x k} = X_{n x k} E_{k x k} \quad (1.13)$$

Esta projeção é uma etapa fundamental para a elegante simplificação proposta por (Ackermann and Cheverud, 2000) para o teste $B \propto W$. De acordo com o método proposto por estes autores, a variação apresentada entre as populações (**B**) é obtida a partir da projeção das médias das populações nos espaços dos componentes principais estandardizados.

- 5 **Teste de regressão de Componentes Principais** Caso a diferenciação das médias representada em **B** tenha se dado por deriva, a expectativa dos modelos de genética quantitativa é de que as matrizes sejam proporcionais em relação a quantidade de variação apresentada em cada Componente Principal. Este teste é realizado numa escala logarítmica através da regressão das variâncias de **B** em função dos autovalores de **W**. Um desvio significativo de 1 indica um padrão que não foi produzido por eventos
- 10 estocásticos, mas por eventos como seleção estabilizadora ou direcional (Ackermann and Cheverud, 2002).

- Teste de correlação das projeções nos Componentes Principais** Desvios da proporcionalidade entre **B** e **W** também podem ser detectados caso as projeções dessas médias nos componentes principais, estejam correlacionadas entre si. Como dito anteriormente, no caso de matrizes de variância e cova-
- 15 riância, os eixos de variação representados pelos componentes principais serão ortogonais por não estarem correlacionados entre si. Entretanto, correlações entre os componentes principais da matriz de variância entre as médias (**B**) podem surgir devido a ação de seleção direcional atuando de forma a favorecer o arranjo entre pares ou conjuntos de direções de variação.

2 Chapter I

Comparative quantitative genetics integration patterns in Strepsirrhini skull

2.1 Introduction

Organisms are cohesive systems made of interacting traits that share different degrees of genetic, developmental and functional processes (Klingenberg, 2008; Wagner et al., 2007). Understanding the causes and the structure of interactions in multivariate systems is the main focus of morphological integration theory (Cheverud et al., 1985; Olson and Miller, 1958). Trait interactions can be represented as the genetic variance covariance matrix ($\mathbf{G}$), which summarizes the amount of heritable variation in populations (Lande, 1979; Lynch and Walsh, 1998). $\mathbf{G}$ is specially convenient when the genetic details are not the main focus (Steppan et al., 2002), such as complex characters regulated by several pleiotropic genes (Arnold et al., 2001; Lande, 1980a; Pavlicev and Hansen, 2011). $\mathbf{G}$ may be decomposed as orthogonal directions of linear trait combinations (Principal Components - PC), ordered by its magnitudes of genetic variance. Therefore, the $\mathbf{G}$ -matrix is an important parameter to model evolutionary change in multivariate phenotypic systems and is a useful tool to predict the response to selection (Lande, 1979, 1980b; Lande and Arnold, 1983). For instance, $\mathbf{G}$ can bias the response to selection if the genetic variance is unevenly distributed along its PCs (Arnold, 1992; Blows and Hoffmann, 2005; Futuyma, 2010; Walsh and Blows, 2009) and the selection is not aligned with these directions. Therefore, $\mathbf{G}$ can facilitate or restrain evolution along the adaptive landscape (Hansen and Houle, 2008; Marroig et al., 2009).

Given the relevance of $\mathbf{G}$ to evolution, there is an increasing interest in investigating how $\mathbf{G}$ structure evolves (Arnold et al., 2008; Barton and Turelli, 1989; Björklund and Gustafsson, 2015; Jones et al., 2003, 2004; Shaw et al., 1995). The field of comparative quantitative genetics approaches this question comparing $\mathbf{G}$ matrices through a broad phylogenetic scale (Steppan et al., 2002). We expect $\mathbf{G}$ to be stable along an evolutionary scale if organisms are under common patterns of stabilizing selection counterbalancing new sources of variation rising from pleiotropic mutations (Barton and Turelli, 1989; Lande, 1980b). Using the skull as model of a multivariate system, a relative $\mathbf{G}$ stability was inferred from comparisons of $\mathbf{G}$ or its phenotypical counterpart $\mathbf{P}$ across several mammalian orders (Goswami, 2006; Linde-Medina et al., 2016; Porto et al., 2009). This general pattern was observed in all genus of Haplorrhini primates (Cheverud, 1982; Marroig and Cheverud, 2001; Oliveira et al., 2009), hence becoming interesting to investigate whether $\mathbf{G}$ stability is also maintained in their sister clade, the infraorder Strepsirrhini (Martin and Martin, 1990).

Representing more than one third in primate species diversity, Strepsirrhini is a monophyletic clade

known for a remarkable diversity in locomotor strategies, social structure, activity patterns and feeding behavior (Mittermeier et al., 2010; Nekaris and Bearder, 2007; Wright, 1999). While Haplorrhini has only one case of nocturnal primate (*Aotus*), the majority of Strepsirrhini are exclusively nocturnal, but there are also cathemeral species active both during daylight and night (Mittermeier et al., 2010; 5 Nekaris and Bearder, 2007; Wright, 1999). Their diet consists of a broad spectrum of different amounts of fruits, gum and leaves. Probably the most extreme examples are the Bamboo Lemurs (*Haplemur*), that show an unusual specialized feeding behavior in primates, the ingestion of toxic bamboo. Another interesting case is the Aye-aye (*Daubentonia madagascariensis*), whose many dental adaptations lead it to be considered a rodent until the end of the 19th century (Mittermeier et al., 2010). The lemurs 10 are endemic to Madagascar (the 4th largest island in the world), and some Lorisiforms are found only in the small islands of Southeast Asia. All these features may influence the structuring of cranial traits (Aristide et al., 2015; Cheverud et al., 1985; Hylander et al., 2005; Kirk, 2006; Marroig and Cheverud, 2001; Ravosa et al., 2000; Viguier, 2004), thus investigating Strepsirrhini species can bring new insights to **G** stability debate.

15 Estimating **G** demands pedigree structure and large samples, which are extremely difficult to obtain for wild populations. However, regarding morphological traits, **G** and **P** are usually proportional (Agrawal and Stinchcombe, 2009; Cheverud, 1988, 1996b; Garcia et al., 2014; Marroig and Cheverud, 2001; Marroig et al., 2004; Oliveira et al., 2009; Porto et al., 2009; Stepan, 1997). Using **P** instead of **G** overcomes operational difficulties in obtaining representative species samples (Pigliucci, 2006), al- 20 lowing a phylogenetically broader analyses. Thus, we use **P** of several Strepsirrhini species to test the hypothesis of covariance pattern stability in this clade. It is important to stress that stability does not require equality among species matrices (Stepan et al., 2002). We expect some level of difference across species mainly due to ecological divergence and historical processes (Marroig and Cheverud, 2001; Roff, 2000). Thus we hypothesize that differences in matrices will be associated with phylogenetic dis- 25 tance and/or diet disparity among species.

2.2 Methods

Measurements and matrix estimation

We placed 22 3D homologous landmarks in bone sutures using a Microscribe MX (Immersion Corpora- tion - San Jose, California) on both sides of the cranium of 1839 specimens. Our sample comprehends 30 40 species, 20 genera and 7 families of Strepsirrhini primates (Details in Supplementary Information – SI). Taxonomy was carefully reassessed using locality information and geographic ranges according to Mittermeier et al. (2010). Following Cheverud et al. (1985); Marroig and Cheverud (2001); Porto et al. (2009) we extracted 39 interlandmark euclidean distances that represent dimensions of singular bones.

2.2 Methods

In order to obtain balanced and appropriate sample sizes, we measured full or partially complete specimens. We obtained specimens from the AMNH, FMNH, USNM, MCZ, DFP, RMNH, AZM, MNHN, RBINS and ZMB collections. A complete detailed sample reference is reported in SI.

Measurement error was assessed through coefficient of variance calculated using the individual mean replicates, and repeatability indexes following Lessells and Boag (1987) using the two replicates by specimen. Trait repeatability describes proportion of variance in a sample that can be attributed to the between individual difference and not to error among replicates. Thus, the higher the value of repeatability the more accurate the measurement procedure.

Here we are not interested in possible differences due to sexual dimorphism on species matrix. Thus, we performed an ANOVA in all species traits and a MANOVA for sample sizes larger than 41. Very few traits showed significant effect of sex and no consistent pattern of sex-specific difference was seen throughout the clade. The lack of sexual dimorphism for body weight and size is well reported for this clade (Cheverud et al., 1985; Kappeler, 1991, 1996; Kappeler and Schäffler, 2008; Tennenhouse, 2015). Thus, sex do not represent a source of variation capable of conceal the genetic structure common to both sexes. A more complete description of these analysis is reported in section 5.1 (SI). All matrices were estimated from raw distance data for all species in order to maintain the criteria to estimate phenotypic matrices.

We also calculated matrix repeatabilities to obtain the maximum possible value of similarity for a particular matrix. Matrix repeatability was obtained through Monte Carlo distribution method, in which we used each observed covariance matrix as the Σ parameter in a multivariate normal distribution to simulate a thousand matrices with the same sample size as the original matrix. Simulated matrices were then compared to the original matrix using two methods of comparison, Random Skewers and Kraznowski, as described in the following section. The value of a matrix repeatability is the average of comparison between all simulated matrices and the original matrix. In order to describe the structure of variation in a broad evolutionary perspective, we calculated the pooled-within group matrices (**W**) for taxonomical levels above species. These matrices are obtained from better samples sizes than species matrix and thus are reliable to investigate matrix stability in the clade.

All the analysis were performed in the R environment (R Development Core Team, 2011) and routines are available for open access in GitHub⁷.

Matrix similarity

We analyzed matrix similarity to investigate the hypothesis of **P** stability in the Strepsirrhini clade. We applied two methods of comparison that have straightforward evolutionary interpretations. These complementary methods reveal different aspects of matrix similarity and, when combined, are a rig-

⁷ VareciaRubra: <https://github.com/VareciaRubra/MScMadagascar>

orous approach to evaluate variance structure. Both methods test the null hypothesis of no similarity between matrices. The Random Skewers (RS) method is the direct application of Lande's equation (Lande, 1979), in which we simulated 1,000 random selection vectors and that were applied on each pair of matrices (Cheverud, 1996b; Cheverud and Marroig, 2007). The matrix similarity is the average correlation between respective paired response vectors to each simulated selection vector (Cheverud and Marroig, 2007). Thus, RS similarity is a measure of how often does a particular pair of matrices produce aligned responses under a same selection scenario.

The Kraznowski (KRZ) method evaluates another relevant matrix property, the degree to which each matrix shares the same subspace of first $(n/2) - 1$ PCs (n being the matrix dimensionality Blows et al., 2004; Krzanowski, 1979). This method calculates the angle between pairs of best-matched principal components. Given that noise is mostly concentrated in the last principal components, the KRZ method can be interpreted as value of similarity between the best estimated dimensions of variation (Blows et al., 2004; Marroig and Cheverud, 2010).

The main source error in variance estimation comes from low sample sizes. Thus we evaluated sample size effect on matrix estimation and on matrix similarity. First we performed a rarefaction analysis on our best sampled species (*Microbebus griseorufus* $n = 68$). In the rarefaction procedure we performed 1,000 resamplings with replacement varying the number of individuals and compared the resampled matrices with the original one using RS and KRZ methods. From it we obtained a reference for appropriate sample sizes to estimate variance/covariance matrices. Second we calculated each matrix repeatability obtained from 1,000 resamplings via Monte Carlo method by simulating a thousand multivariate distributions using original $\mathbf{P}$ variances (page 81). Matrix repeatabilities are the average comparison between simulated matrices by Monte Carlo and the original matrix. Thus, matrix repeatability represent the maximum value of comparison of a given matrix. We used matrix repeatabilities to correct each pairwise comparison, since the highest expected value for each pairwise comparison is the geometric mean of matrix repeatabilities (Cheverud, 1996b; Cheverud and Marroig, 2007; Porto et al., 2009). Second, to investigate the effect of lower sample sizes in matrix comparison we used a correction factor regarding the slope of the regression between matrix similarities and the inverse of the harmonic mean of sample sizes for each pairwise comparison as a correction factor (Steppan, 1997).

Given that both RS and KRZ methods evaluate matrix similarity based on their direction and amount of variance, we calculated the observed variance explained by the first four PC as a proportion of the total variation. Intervals of confidence for these values were obtained though Monte Carlo. We expect to see lower similarities between matrices with more difference in the proportion of variance explained by their first PCs.

To determine the degree of stability in observed $\mathbf{P}$ we calculated pooled-within groups matrices for each taxonomical level above species. We expect these matrices to show high levels of similarity among

them, considering their higher sample sizes. We also regard such matrices the best available estimate for a given group ancestral phenotypic

genetic covariance matrix. Furthermore, we also incorporated to our analysis a pair of *Saguinus fuscicollis* **P** and **G** obtained from Cheverud (1995). Comparing our phenotypic matrices with **G** and **P** estimated for another primate lineage is useful for evaluating the correspondence between our **P** estimates and their underlying genetic covariance structure, given that Cheverud (1988) conjecture (Roff, 1995) predicts high levels of similarity between **P** and **G**.

As previously emphasized, while approaching matrix stability investigation, we do not expect to find equality between all species **P**. Therefore, we investigated if matrix similarity holds any pattern associated with phylogenetic structure. We applied a regression between matrix similarity values and respective pairwise phylogenetic distances and used Mantel correlation to evaluate the degree of similarity between these two matrices. We expect matrix similarity to be negatively related to phylogenetic distance. The phylogeny used in this study is a combined genetic and anatomical data of 88% of Malagasy lemurs species and some members of Lorisiforms. It accounts for extinct and living lemurs, being the most complete evolutionary phylogeny containing lemurs to date (Herrera and Davalos, 2016). This phylogeny used pioneer methods to ensure statistical independence between traits and revealed well-supported relationships among living and extinct lemurs (Horvath et al., 2011; Yoder, 2012; Yoder et al., 1996b). Their phylogenetic dating also confirmed previous molecular studies estimating that lemurs first radiation appeared 50-60 MYA by tip-dating (TD) and fossilized birth-death process (FBD) (Herrera and Davalos, 2016).

Moreover, to determine the degree in which each trait contributes to matrix dissimilarity, we applied the Selection Response Decomposition method (SRD). SRD is an extension of the RS method that performs a trait-specific partitioning of the response vector (Marroig et al., 2011). The SRD correlates each trait mean response to random selection for a given pair of matrices, the SRD score (hence 39 in total). We then compare the degree of deviation of each SRD score and its standard deviation with the global similarity (which considers the mean response of all traits, and is strongly related with the RS value of similarity). Most dissimilar traits will have high deviations between SRD score and the global mean response. Therefore, we can determine which traits influence matrix dissimilarity the most. We performed this exploratory investigation in trait-specific influence to matrix similarity in an evolutionary perspective. First we compared pooled-within matrix of more internal nodes that represent main cladogenesis events such as the divergence between families and superfamilies. Second we compared all genera within the Lemuridae that have significant differences in cranial shape and diet degree of specialization.

2.3 Results

Cranial traits and Matrices repeatability

Cranial traits repeatabilities by species are higher than 0.95 in 96% of the sample (page 80 – SI), and Mean matrix repeatabilities calculated via Monte Carlo are higher than 0.9 using RS and higher than 0.8 for KRZ (page 81 – SI). Thus, matrix errors are under acceptable ranges of measurement and **P** can be considered reliable to proceed with analysis. Nevertheless, those matrices with sample sizes lower than 40 must be evaluated more carefully.

Matrix Similarity

A summary view of matrix similarity, repeatability and sample size by species is given in Figure 2.1. We report the distributions of observed values of comparison for both methods RS and KRZ and corrections using matrix repeatability and sample sizes. The vast majority of pairwise matrices similarity values ranged from moderate (0.6–0.8) to high values (0.8–0.9) depending on the species considered, the method and the correction applied. Nevertheless, when we corrected the values of similarity accounting for errors associated with sample sizes (Steppan, 1997), the ranges are narrower and values are higher (Figure 5.5 – SI). Details about sample composition, observed matrix repeatabilities and average similarity at Supplementary Information. Observed values for any particular pairwise species comparison obtained using RS and KRZ are also reported at SI (Figure 5.3 for raw values, Figure 5.4 for corrected values using Monte Carlo repeatabilities).

Figure 2.1 – Similarity values by species using Random Skewers and Krzanowski methods. Each plot shows the distribution of observed values of similarity, the mean value observed in dotted lines and the mean value obtained without taking *Euoticus elegantulus* sample into account (closed lines). **a-b** are raw values observed; **c-d** corrected values using Monte Carlo repeatabilities of each respective pair of matrix involved in comparison, and the range of Monte Carlo repeatabilities calculated from 1000 simulations in gray horizontal bars; **e-f** values of similarity corrected using sample size correction. N on the right side of the grids gives the information of each matrix sample sizes.

Ranges and mean of observed matrix similarity by species can be found in Figure 2.2 combined with results from the rarefaction procedure. For both RS and KRZ methods, we can see a similar pattern in rarefaction. Although, RS shows broader values of comparison, regardless of sample sizes, while KRZ shows more narrow ranges and higher values.

Figure 2.2 – Investigating sample size related errors on matrix estimate and values of comparison. In **gray** are the box-plots of mean similarity obtained from rarefaction analysis applied to (*Microcebus griseorufus* ($n = 68$)). **A** matrices were compared using Random Skewers method and in **B** using Krzanowski Correlation method. The same pattern of rarefaction was observed for the largest Strepsirrhini *Indri indri* ($n = 59$). The ranges of comparison are represented with the interval of confidence of 95% of the range of comparisons per species (as reported in page 83); **triangles** represent the mean value of similarity (as reported in page 81). **Colored vertical lines** represent mean values of similarity for the whole set of matrices comparisons.

5 The proportion of observed variance in the first four PC with respective interval of confidence are reported in Figure 2.3. We can see that in general PC1 ranged from 0.2 — 0.4 and Loriformes and the Cheirogaleidae shows values higher than 0.4. PC2-4 values are lower than 0.2 and showed similar pattern in all species. The pattern observed for PC1 was also observed for integration (r^2) and flexibility (results not reported).

Figure 2.3 – First 4 PCs' proportion of variance per species. Observed values are represented by points and the bars represent the 95% interval of confidence obtained from Monte Carlo.

2.3 Results

High taxonomical levels showed higher values of similarities while lower values of comparison are found between more phylogenetic distant taxa. Similarity also increase with the increase of the harmonic mean between matrices sample sizes.

Figure 2.4 – Species Mean matrix evolutionary statistics. We can see that *Loris* and *Phaner* are genus with species highlighted as outliers in some of them. These genera will be better investigated to account for possible species identification problems through a discriminant analysis. *Propithecus verreauxi* seems to have a much lower variance than the others.

In Table 2.1 we show a summary of similarity between *Saguinus fuscicollis* P and G matrices and all species matrices. Similarities between ancestral matrices estimated by Genus, Family, Super family and Infraorder, and combined with *Saguinus fuscicollis* P and G are reported in Figure 2.5. Ancestral matrices showed higher levels of similarity in both methods and the ranges of similarities are common in both methods.

Table 2.1 – Summary of Strepsirrhini species P similarity with *Saguinus fuscicollis* G and P matrices.

Method	Matrix	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.
RS	G	0.33	0.45	0.51	0.49	0.54	0.61
KRZ	G	0.52	0.56	0.57	0.57	0.58	0.61
RS	P	0.38	0.60	0.66	0.64	0.69	0.72
KRZ	P	0.60	0.65	0.69	0.69	0.72	0.76

The SRD results are reported in a straightforward representation using wireframes that describe the cranium shape of living species by clade. In this representation we report the mean deviation from the general SRD score by trait. In Figure 2.6 are the results from the comparison between ancestral matrices that represent main nodes of the phylogeny. We report the SRD general score observed for the comparison between genus matrices that represent each families and diet habits in Table 2.2 and a graphical representation of these results can be found in Figure 2.7.

Figure 2.5 – A Raw values of comparison by RS (upper triangle) and KRZ (lower triangle) calculated using pooled within matrices of taxonomic levels above species. Each matrix named with a W represent internal nodes as referenced in the phylogeny on the **B** panel. Samples sizes are reported at diagonal.

Figure 2.6 – SRD results for the main nodes in the phylogeny of Strepsirrhini. The mean deviation from general mean SRD is represented in the wireframes to facilitate visualization. They describe the cranium shape of living species of each clade, and the color scale represent the degree of deviation between a specific trait SRD score to the general mean. In grey are the traits with close values from the general mean and in red those with high deviations from the general mean. The value under each wireframe is the observed general mean SRD score. The phylogeny indicates the relative position of nodes and the relationship between all 7 families.

Table 2.2 – General mean scores obtained using SRD method to compare main dietary categories of genus of primates from Madagascar. Columns refer to dietary category of the Genus in each row: **Omn** - omnivore, **Fru** - frugivore, **Bam** - bamboo, **Fol** - folivore, **Gum** - gumivore.

Genus/Diet	Omn	Fru	Bam	Fru + Fol	Fol	Omn	Gum
Daubentonia							
Varecia	0.56						
Hapalemur	0.56	0.51					
Propithecus	0.73	0.73	0.66				
Lepilemur	0.52	0.74	0.65	0.51			
Microcebus	0.70	0.80	0.67	0.68	0.70		
Phaner	0.71	0.46	0.67	0.68	0.77	0.63

Figure 2.7 – SRD comparison between representants of Malagasy primates main dietary categories. The results are displayed in wireframes that represent the cranial shape of the respective genus. The color scale represent the degree of deviation between a specific trait SRD score to the general mean. In grey are the traits with close scores from the general mean and in red those with high mean deviations. The general mean SRD score for each pairwise comparison can be found in Table 2.2.

2.4 Discussion

The mammalian cranium is considered a complex morphological structure because its several bones have different developmental origins and are engaged in various functional aspects. Thus, the functional/development coordination between all these parts is responsible for the structure performance as a whole. As represented in the genotype-phenotype map (Wagner, 1984b), the amount of variation expressed in **P** relies in the interaction between multiple function and developmental constraints in **G** interacting with environmental factors. For closely related organisms, though, it is reasonable to assume that underlying **G** will have similar developmental constraints. Hence, regardless of differences or particularities in environmental factors, those will act through the same developmental routes and these common patterns of stabilizing selection will be reflected in similar patterns of cranial variation (Klingenberg, 2008).

In general, there was considerable similarity between the patterns of covariance in the cranium of Strepsirrhini living species. The average levels of similarity observed between all Strepsirrhini **P** and the pair of **G** (0.49 for RS and 0.57 for KRZ) and **P** (0.64 for RS and 0.69 for KRZ) of *Saguinus fuscicollis* are considerably stable (Table 2.1) and similar to those reported to other primate lineages. Such levels of similarity can be due to shared patterns of internal stabilizing selection underlying the genetic structure of the clade of primates as a whole. Furthermore, when interpreted in the light of Cheverud's conjecture (Roff, 1995), the observed levels of similarity indicate that Strepsirrhini **P** are reliable rep-

representations of their underlying genetic variance covariance structure. Besides some methodological limitation in estimating $\mathbf{G}$ in wild populations, morphological $\mathbf{P}$ matrices are reliable surrogates to its genetics counterparts (Cheverud, 1988; Garcia et al., 2014), and it seems to be the case for Strepsirrhini primates. In a species level, similarities using both RS (average of 0.65 for raw values of comparison, 0.74 for repeatability-corrected values and 0.86 for sample size corrected values) and KRZ (averages of 0.7, 0.79, 0.82) methods showed relative broad ranges of comparison values (Figure 2.1). Distributions of KRZ observed similarities per species had narrower ranges and higher values in general (Figure 2.2), probably due to the fact that, in the KRZ method, the error accumulated in the last PCs is not considered. Furthermore, similarity considerably increased for comparisons between taxonomic levels above species. For instance, comparisons with the pooled-within species matrix that represent the root ancestral of all Strepsirrhini primates ranged between 0.68 to 1 for RS method and from 0.7 to 1 using KRZ method (Figure 2.5). These ancestral matrices are better estimations of the underlying genetic covariance structure in the clade of Strepsirrhini primates given it is based on larger sample sizes. Besides that, this result can be interpreted as a considerable stability of observed similarity along the evolution of the clade as a whole.

It is clear in our results that some limited exceptions showed considerable and consistent lower values of similarity in any given comparison and correction, which is affecting all average and ranges of similarity. Well estimated matrices must be composed by a minimum sample size of same value as the number of traits it represents. Furthermore, it is well known that reduced samples do affect size estimates (Cardini and Elton, 2007). Herein, results regarding samples < 39 must be carefully interpreted. Nevertheless, the rarefaction analysis shows that samples larger than 20 produce better estimates for variance covariance matrices (Figure 2.2). The broad ranges of observed similarity using RS method may also reflect other practical issues regarding taxonomic delimitation. The Lorisiform primates are the least studied clade of primates (Nekaris and Bearder, 2007), and this lack of information is reflected in collections, because many of these species are rare in museum collections and lack locality information. Furthermore, many Strepsirrhini show high levels of cryptic diversity (Nekaris and Bearder, 2007; Tattersall, 2007), which may be considered as a probable source of error in identification. Thus, some taxonomic difficulties can bias the observed similarities in the species level. For instance, all the nocturnal primates show brownish to grayish fur coat, with soft nuances in shades that can fade easily, and cases of misidentification based on fur color are reported for these very cryptic species (Nekaris and Bearder, 2007). Nevertheless, this is the first study to estimate cranial traits variation in a multivariate scale of these rare specimens, thus we considered appropriate to report observed values, even for those with poor sample (less than < 40 specimens). Interestingly *Daubentonia madagascariensis* (sister clade with all other primates from Madagascar, but with highly specialized morphology aspect that resembles a rodent) also showed low values of comparison in RS method, but moderate in KRZ.

Another Malagasy primate that showed relevant disparity with other matrices comparisons is *Phaner furcifer*, but this genus display a highly adapted feeding behavior to the consumption of gum and our sample consist of 28 specimens. Tarsiers used to be considered in the old clade "prosimian" together with Strepsirrhini but is now placed inside Haplorrhini. Both *Tarsius* species and the pooled-within species matrix for the Tarsier genus showed remarkable disparity with all other matrices (< 0.6 for raw values in both species and both methods). Nevertheless, it is well known that reduced samples do affect size estimates (Cardini and Elton, 2007), and results regarding samples < 30 must be carefully interpreted.

We did not expect a complete equality between estimated **P** matrices. Stabilizing selection limits its developmental processes involved in the expression of tissue and bony structures in the cranium (Cheverud, 1996a). On the other way around, these processes are regulated by a large set of genes of small effects (Fisher, 1918). Thus, the action of stabilizing selection is not strong in all locus and the expressed phenotype will display some level of quantitative variation. Therefore, it is reasonable to assume the existence of an acceptable degree of variation around a given adaptive peak. Thus, some directions of the morphospace will have certain variation without compromising fitness (Hallgrímsson and Hall, 2011). For example, the grown and occlusion between upper and lower jaw must be coordinated to satisfy the performance of several functions involved in feeding behavior during an individual life span (Cheverud, 1996a). Complex genetic systems like this are flexible enough (Lieberman, 2011) and may respond to selective pressures in few generations, thus a coordinate elongation of the facial region that preserves the coupling between the jaws may still satisfy selective pressures involved in chewing.

Our results indicated that the observed patterns of variance are structured along the phylogeny. Mantel correlation between matrix similarity and phylogenetic distance is considerable high (−0.58 for RS and −0.53 for KRZ). These results are aligned with others that investigate lemur cranial diversity and report a strong phylogenetic signal in cranial shape (Baab et al., 2014). Furthermore, if combined with overall values of similarity in more internal nodes, these results may suggest that the overall pattern of variance in the cranium has remained relatively stable during the diversification of the Strepsirrhini clade, while some differences seem to be associated with main historical events of diversification in the Family level. Dietary variation is also partitioned among more internal nodes of the phylogeny and some authors argue that this may reflect niche conservatism (Baab et al., 2014). It is well known that dietary patterns are strongly related within the Strepsirrhini phylogeny (Federman et al., 2016; Fleagle, 1999; Meloro et al., 2015; Mittermeier et al., 2010) and that diet is reflected in anatomical features (Kirk, 2006; Meloro et al., 2015; Scott, 2012; White, 2009), leading to some degrees of homoplasy among taxa of similar diets.

The exploratory analysis using the SRD method evaluated if traits responsible for observed dissim-

ilarities in matrices reflect the main dietary shifts along the phylogeny. Our results from SRD comparison between the ancestral matrices that represent the divergence in nodes of phylogeny above family level (Figure 2.6) highlight considerable high levels of SRD general score (between 0.78 and 0.92). Exceptions were the extreme and peculiar cases involving species with specialized anatomic features, such as like Strepsirrhini vs. genus *Tarsius* (0.59) and Lorisiformes vs. Daubentonidae (0.65), or matrices with very low sample sizes, such as within the Galagidae (0.36). Our results showed that traits located in the face represent considerable amount of observed difference and will be discussed with more emphasis regarding dietary habits. Some traits located in the cranium base and vault are also dissimilar along the clade. Traits located in the cranium base are engaged in fundamental process during early stages of brain and face development and along an individual whole life (e.g. wall that support brain and eyes, delimitation of main blood vessels). Nevertheless, these traits' strong correlations with other parts of the cranium during first stages of development tends to fade in later stages of adult life because of further development of other parts (Hallgrímsson et al., 2009; Hallgrímsson et al., 2007; Lieberman, 2011). Thus, the basicranium in the adult usually has lower values of correlation with other traits inside and outside this region, and their correlation pattern tends to behave in an erratic way among species. The relative brain size is usually adopted as a measure of encephalization and has been hypothesized as the main factor influencing the evolution of the cranial base angle among primates (Lieberman et al., 2008; Moss and Young, 1960). Although, Strepsirrhini primates show the lowest levels of encephalization among primates, while being notorious for their relative large eyes and a long rostrum (Bennett and Goswami, 2012; Fleagle et al., 2010; Isler et al., 2008).

We also applied the SRD method to compare Malagasy primates of different dietary categories. Interestingly our results showed that dissimilarities with the highest deviations from the general mean are concentrated in the oral, nasal and zygomatic regions (Figure 2.7). These results may reflect differences in patterns of selection related with mechanical processes during feeding behavior. Ross and Wall (2000) mentioned that Strepsirrhini primates, different from other mammals, may have unusual high ratios of working/balancing-side muscle activity during mastication, and Vinyard and Taylor (2010) suggested a potential functional relationship between muscle architecture and the ability to generate vertical force during chewing. In a more physiologically detailed chewing biomechanical analysis, Perry et al. (2011) compared primates mandibular adductor muscles' physiological cross-sectional area (PCSA) in showing it is isometric to body size in frugivores and positively allometric in folivores, suggesting that muscle architecture does reveal dietary signals. These authors also showed that PCSA increases with body size in folivores Strepsirrhini, suggesting a need for greater chewing force in large-bodied animals. Relative to body mass, they also found that jaws and consequently faces are longer in frugivores than in folivores, while small folivores showed the shortest jaws and faces. They argue that very short jaws might compensate the disadvantage in small-bodied folivores by decreasing the bite

force load arm and by reducing bending moments. [Vinyard and Hanna \(2005\)](#) could distinguished folivorous species from other dietary categories Strepsirrhini by first molar lengths and widths and showed a strong correlation between M1 area and the relative size of the facial skull, arguing that this association might rise from shared development between these elements. [Scott \(2012\)](#) investigated molar and postcanine size in relation to body size and diet and argues that among folivores Strepsirrhini, the variation associated with relative facial size seems to be phylogenetically structured. Primate eye size is another feature highly influenced by diet ([Kirk, 2006](#)), being omnivorous Strepsirrhini the ones with largest eye size among the whole diversity of primates. The presence of a postorbital bar is strongly related to the stabilization of orbital margin that ensures visual acuity during chewing and biting ([Ravosa et al., 2000](#)). Thus, some of the differences around the orbits may not be exclusively related with nocturnal habit, but with dietary mechanical advantages.

Another interpretation to some observed dissimilarities between matrices using RS method is that more disparities in the distribution of variance along matrices first PCs will decrease their observed values of similarity. PCs are ordered by their contribution to total variance and the displacement of variance in the first four PC can lead to differences in response to selection. In our samples, species matrices with lower average similarities were also those with higher deviations from the average PC1 percent (higher then 0.4), such as the members of Cheirogaleidae, Galagidae and Lorisidae families. The level of variance explained by a matrix first principal component accounts for the majority of variance in a given matrix and can be interpreted as a constrain because depending on its alignment with the adaptive landscape it can facilitate or bias the response to selection ([Schluter, 1996](#)).

The first principal component is usually interpreted as size ([Porto et al., 2009](#); [Wagner, 1984a](#)), a biological feature of great relevance for morphological evolution. This is also the case in our matrices, where all species show scores of same signal in this PC, if not, negative values are close to zero. In morphological integration theory, size is a major factor affecting the overall magnitude of integration in complex structures. The New World Monkeys, in which the diversification occurred along allometric lines ([Marroig and Cheverud, 2005](#)), also have low to moderate contribution of PC1 (0.2–0.4%). Thus, we may predict that Strepsirrhini primates may also have diversified along size. [Baab et al. \(2014\)](#) showed that lemur lineages have diverged along both allometric and non-allometric axes of shape variation. Their distribution in the morphospace is defined by two main axes that describe first the variation in prognathism and the relative width and height of the neurocranium; and second an allometric pattern related to relative orbit size and the orientation of the cranial vault relative to the rostrum ([Baab et al., 2014](#)). Eye growth is likely to exert an early influence on facial morphogenesis, specially in small-bodied nocturnal species ([Jeffery et al., 2007](#)). Thus it becomes interesting to investigate the effect of size in the detection of modules regarding the orbits and the face. Furthermore, [Cummings et al. \(2012\)](#) showed that differences in orbit morphology between nocturnal and other Strepsirrhini are more pro-

nounced postnatally, when bone expansion outpaces eye tissue growth. The orbital aperture continues to grow even in the absence of the eye (Sarnat and Shanedling, 1972), which suggests that bone and soft tissue elements have different growth potentials (Cummings et al., 2012). Jeffery et al. (2007) investigated eye growth in Strepsirrhini, and showed that in general prenatal growth corresponds to more than a half of total eye diameter growth. Lorisids and tarsiers are primates with the relatively largest orbits as adults (Kirk, 2006) and were exceptions to this tendency. The authors suggest that eye size may be constrained by spatial limitations in parturition in these species. It becomes interesting now to investigate how allometric and non-allometric shape variation structures covariance patterns throughout lineages of Strepsirrhini primates.

2.5 Conclusions

The $\mathbf{G}$ matrix plays an important role in determining species diversification. $\mathbf{G}$ accounts for patterns and magnitudes of connection between traits, which can act as constraints or facilitating evolutionary trajectories. Understanding the stability and evolution of $\mathbf{G}$ is still focus of intense discussion since late 1980's and is still an open question (Arnold et al., 2008; Barton and Turelli, 1989; Björklund and Gustafsson, 2015; Jones et al., 2003). In this study we contributed to this relevant evolutionary biology question through comparative quantitative genetics in a broad phylogenetic context applying a number of different but complementary analyses. We evaluated the degree of similarity between $\mathbf{P}$ of 40 Strepsirrhini primates species combined with a pair of $\mathbf{G}$ and $\mathbf{P}$ matrices of *Saguinus fuscicollis*. We report considerable similarity between the covariance patterns of variation, and an increase in similarity in more phylogenetic close related species. Although, limited exceptions can be due to taxonomical or restricted sample sizes. In general, our estimated $\mathbf{P}$ matrices can be considered fair representatives of their underlying $\mathbf{G}$. Specially for ancestral matrices that represent main nodes of the diversification of the clade we report high values of similarity observed in all methods of comparison applied. Furthermore, we showed that traits responsible for $\mathbf{P}$ matrices differences are located in the oral, nasal and zygomatic region, and may be under different patterns of directional selection involved in chewing behavior. Our results allows the expansion of microevolutionary aspects of quantitative genetics framework to a more broad taxonomic level to investigate macroevolutionary scenarios of Strepsirrhini morphological evolution.

3 Chapter II

Inferring Evolutionary Process in Malagasy Lemurs Drift vs. Selection

3.1 Introduction

5 Evolutionary biologists are interested in revealing the historical processes responsible for biological diversity. In a microevolutionary scale, which deals with changes within a few generations, processes such as mutation, genetic drift, natural and sexual selection have been proposed to explain divergence among populations. This microevolutionary framework has been applied to macroevolution, that focus on divergence above the species level. The adaptive landscape concept as proposed by Simpson
10 (1944) connects micro and macroevolutionary scales by combining changes in phenotypic means with changes in adaptive peaks (Arnold et al., 2001; Hansen and Martins, 1996). The adaptive landscape defines the relationship between a given phenotype and the average fitness of a population (Dietrich and Skipper Jr, 2012). Quantitative genetics theory has modeled the adaptive landscape by defining parameters to describe evolutionary processes (Felsenstein, 1985; Lande, 1979; Lande and Arnold, 1983). For
15 example, the strength of directional selection can be measured as the slope of the adaptive landscape, whereas the strength of stabilizing selection is defined by its curvature (Arnold et al., 2001). Furthermore, genetic drift is considered the default topography for the adaptive landscape, represented as a flat and level surface (Arnold et al., 2001). In such scenario, selection does not affect the evolution of population mean, which evolves randomly and display a recognizable pattern around the ancestral
20 mean (Arnold et al., 2001; Lande, 1980b).

The **G** matrix is a fundamental concept in evolutionary quantitative genetics, which describes the amount of available additive genetic variance within populations (Lande, 1979). The pattern of divergence between population means depends on the strength and type of evolutionary processes operating on the ancestral **G** matrix (Lande, 1979, 1980b). Thus, multivariate directions that accumulate
25 most variance in **G** are expected to impact between-population divergence across generations. Hence, comparing within and between-population variation is essential to infer processes shaping phenotypic divergence (Ackermann and Cheverud, 2000). The quantitative genetics theory display of models to evaluate the divergence of average phenotypes in several vertebrate systems, specially in the cranium (Ackermann and Cheverud, 2000, 2002; Marroig and Cheverud, 2004).

30 Along the primate lineages, an interesting pattern is observed when genetic drift was tested as a sufficient explanation for observed cranial differentiation among species. While in New World Monkeys (NWM) there is a strong signal of directional selection as the process underlying the morphological

evolution within this group (Marroig and Cheverud, 2004); conversely in Old World Monkeys (OWM) substantial divergence can be explained by random drift alone (Oliveira et al. submitted). Nevertheless, in order to understand the general evolutionary pattern in the primate clade as a whole, an investigation of the relevance of selection and drift on the Strepsirrhini lineage is required. Strepsirrhini is a monophyletic clade that diverged early from Haplorrhini lineage (NWM, OWM and Tarsiers) and comprises the Galagos, Lorises and the endemic primates from Madagascar, the Lemurs and the Aye-aye (Herrera and Davalos, 2016; Horvath et al., 2011; Ravosa and Dagosto, 2006; Roos et al., 2004; Yoder, 2012).

The Strepsirrhini display considerable diversity of diet, locomotion and activity patterns as well as remarkable shape and size range (from the 30g tiny *Microcebus berthae* up to the very recently extinct subfossil lemurs with 85kg *Megaladapis edwardsi*) (Mittermeier et al., 2010; Nekaris and Bearder, 2007; Wright, 1999). Although Madagascar has a large total area, its insularity is strongly biased by its peculiar topography, as reflected in high levels of local isolation and endemism (Goodman and Ganzhorn, 2004; Martin, 1972; Masters et al., 1995). The endemic primates from Madagascar are a monophyletic clade often used as an example of adaptive radiation because of its remarkable species diversity and correlation between anatomical and ecological features (Godfrey, 1988; Karanth et al., 2005; Martin, 1972; Poux et al., 2005; Wright, 1999). Changes for both increase and reduction in size is a well known phenomena for island vertebrates, as suggested by the so called "island rule" (Lomolino, 1985). Therefore, we expect natural selection as the main process guiding morphological divergence specially in the Malagasy clade. Yet, as seen in OWM, and specially in early hominins and in the genus *Homo* (Ackermann and Cheverud, 2004), genetic drift may have promoted morphological disparity on these clades. Thus, despite variation in complex morphological structures often being assumed to be as adaptive (Lynch, 2007), here we test the null scenario of diversification by neutral evolution (genetic drift) as a sufficient explanation to the divergence between Strepsirrhini primates.

3.2 Methods

Sample and matrices

In order to describe the amount of variation in the Strepsirrhini clade we collected two replicas of 3D landmarks on both side of the the cranium using a Microscribe MX and calculated 39 euclidean distances between them following previous studies (Cheverud, 1995; Marroig and Cheverud, 2001; Porto et al., 2009). We sampled 70 species representing 24 genera and 7 families of Strepsirrhini primates. In total we measured 1839 specimens and accessed ten collections in United States and Europe, including the AMNH, FMNH, USNM, MCZ, DFP, RMNH, AZM, MNHN, RBINS, ZMB (complete detailed sample reference is reported in the supplementary information (SI) in page 80).

From euclidean distances we estimated phenotypic matrices of variance and covariance $\mathbf{P}$ for all species with sample sizes larger than 15. Our operational variables in this study are the multivariate means per species and their respective $\mathbf{P}$, which for morphological traits is a reliable surrogate to its genetic counterpart $\mathbf{G}$ (Cheverud et al., 1989; Garcia et al., 2014). Although some authors discuss the applicability of P-G substitution, matrix similarity was explored in a previous studies, showing a considerable high level of shared structure among our $\mathbf{P}$ matrices (section 2). Given that our average levels of similarity between matrices are higher than 0.6, we can consider that all populations have similar distributions of multivariate genetic variance, satisfying, satisfying one critical assumption for the application of multivariate models to study the morphological evolution on a broad phylogenetic perspective (Prôa et al., 2013).

We calculated the ancestral population matrix $\mathbf{W}$ that represent the base of Strepsirrhini lineage as the pooled within-species matrix. We assume that such matrix is a reasonable approximation for the ancestral $\mathbf{G}$ matrix at the root of the phylogeny. We used this basal $\mathbf{W}$ in all of the following genetic drift test because it allowed us to compare results obtained for each node in a more straightforward manner. With this decision of fixing $\mathbf{W}$ we consider the same set of directions of variance to interpret results. We also estimated the ancestral matrix for each node, using only the $\mathbf{P}$ from descendant taxa of a particular node and these matrices showed high levels of similarity with the basal $\mathbf{W}$ (section 2). We only applied the following drift tests in nodes with more than 4 tips. We obtained each node $\mathbf{B}$ matrices by projecting their respective descendant tips multivariate means in the PCs of $\mathbf{W}$. Furthermore, results using each respective $\mathbf{W}$ matrices are similar to these reported. The phylogeny used in this study is a combined genetic and anatomical data of 88% of Malagasy lemurs species and some members of Lorisiforms. It accounts for extinct and living lemurs, being the most complete evolutionary phylogeny containing lemurs to date (Herrera and Davalos, 2016). This phylogeny used pioneer methods to ensure statistical independence between traits and revealed well-supported relationships among living and extinct lemurs (Horvath et al., 2011; Yoder, 2012; Yoder et al., 1996b).

Drift tests

In the late 1970 Russell Lande accounted for the dependence (covariation) among multiple traits and developed the quantitative genetic theoretical framework usually summarized in the famous multivariate equation of adaptive response (Lande, 1979):

$$\Delta z = G\beta \quad (3.1)$$

where Δz , the vector of adaptive response to selection for all traits, is a product of the underling structure of inheritance of such traits, represented by $\mathbf{G}$; and β is the selection gradient vector, which rep-

resents the effect of directional selection. Thus, morphological evolution can be investigated from a perspective that combines its inheritance and the effect of evolutionary process like natural selection. Patterns of genetic variation within species play an important role in determining evolutionary diversification (Ackermann and Cheverud, 2002). Nevertheless, multivariate means can evolve even in the absence of selective pressures, following a trajectory described by Brownian motion (Arnold et al., 2001). 5

Following Lande (1980b), if populations means have diverged over generations by random processes alone, the observed divergence among phenotypes is a function of the amount of genetic variance present in the ancestral population, the effective size of the evolving populations (N_e), and the time since divergence (t):

$$B_t = G(t/N_e) \quad (3.2)$$

in which $\mathbf{B}$ is the between-taxon variation obtained from multivariate means. In the following tests our ancestral $\mathbf{W}$ substitutes $\mathbf{G}$ in Equation 3.2. For any given comparison the, ratio between t/N_e is a constant and we test the hypothesis of genetic drift by evaluating the $\mathbf{B} \propto \mathbf{W}$ proportionality (Lande, 1980b). For philosophical implications of considering random drift as the null scenario see Lofsvold (1988). 10

We investigated the expectation of proportionality through two methods, as proposed by Ackermann and Cheverud (2002). In the first one we compared the proportionality of variation expected on principal components through a regression on a logarithmic scale and in the second one we investigate the alignment of their main axis of variance by the correlation between scores of each species means projected in the space of $\mathbf{W}$. Schematic representation is given in Figure 3.1 and more detailed in the following section. If this model is rejected, the logical alternative hypothesis is that natural selection was primarily responsible for the observed morphological diversification. 15 20

Given that the orientation of PCs is arbitrary, the comparison between $\mathbf{B}$ and $\mathbf{W}$ can be simplified by reducing $\mathbf{W}$ to its principal components (ordered by their level of variance). Thus, $\mathbf{W}$ is written as a diagonal matrix with no covariances among its PCs, and PCs scores are calculated for each population by multiplying trait means by the standardized within-population PC loading. The between-population variance in each principal component is then calculated as the variance among populations means PC scores. 25

Regression Method

The null hypothesis of drift is tested thorough a regression in logarithmic scale as proposed by (Ackermann and Cheverud, 2002):

$$\ln(B_i) = \ln(t / N_e) + \beta \ln(W_i) \quad (3.3)$$

where B_i is the between-population, W_i is the within-population eigenvalues for the i^{th} PC. Testing
 5 the null hypothesis of proportionality relies on investigating the regression slope β . If divergence in means was produced by genetic drift, we expect β statistically equal to one. Non-significant deviations from 1.0 means fail rejecting the null hypotheses of genetic drift. Significant deviations from 1.0 might indicate a non-random process, and selection can be an alternative hypotheses. Lower sample sizes in the estimation of variance in $\mathbf{B}$ tent to increase the uncertainty in estimation of its eigenvalues and
 10 consequently. Thus, to avoid the occurrence of Type II error we only applied the test in nodes with more than 4 species. As for Type I errors, rates are acceptable if diverging populations have similar patterns of variance and covariance (Prôa et al., 2013), and our $\mathbf{P}$ matrices satisfies this assumption.

Considering a very strictly neutral evolutionary model, increasing divergence time will increase the dispersion among groups and consequently increase the constant (t / N_e) . Nevertheless, this ratio represents the intercept of the regression on the logarithmic scale, and the expectation of 1.0 for the regression slope β is maintained.
 15

Correlation Method

The orientations of a variance covariance matrix PC, are by definition orthogonal and uncorrelated with each other. Thus, when the descendant populations means are projected in $\mathbf{W}$ morphospace we
 20 expect their scores to show no correlation in any given pair of PCs. The tested null hypothesis of drift is of no correlation between scores in any PC as a scenario of drift. This null expectation of no correlation is clarified if we consider that under diversifying directional selection, $\mathbf{B}$ is obtained from:

$$\mathbf{B} = \mathbf{G} \mathbf{C} \mathbf{G} \quad (3.4)$$

where $\mathbf{C}$ is the variance covariance matrix between selection gradients for morphological traits (Felsenstein, 1988; Zeng, 1988). Thus, signals of correlated evolution may rise in $\mathbf{B}$ from two main sources:
 25 underlying common inheritance (as captured in $\mathbf{G}$) or from co-selection (as captured in $\mathbf{C}$).

The correlation genetic drift test is applied through a Pearson correlation between the projected scores of $\mathbf{B}$ in the PCs of $\mathbf{W}$. We used Bonferroni correction for multiple comparisons to evaluate the significance of observed p values. The correction devises all observed p -values by the number of tested

3.3 Results

correlations ($d^2/2 - d$, being d the number of PCs, 39 in this case), Thus, significant correlations are those of p-values lower than 1.6×10^{-5} . We considered all 39 PCs in the Bonferroni correction, but we will elaborate our discussion around the first 4 PCs only because they accumulate less error than last ones (Berner, 2012; Marroig et al., 2012).

Figure 3.1 – Scheme of drift tests as proposed by (Ackermann and Cheverud, 2000), based on the expectations from the null models of quantitative genetics. **I** If drift was the responsible for morphological evolution we expect a proportionality between the the ancestral population (G in green) and the divergence of multivariate means (purple dots) of descendant populations, as captured by B in shadow purple. In the drift tests we evaluate the proportionality between B and G . **II** Here we obtained P matrices (in red) from cranial traits that can be used as substitutes for its underlying G (in blue on previous box). From P we obtained pooled-within matrix W (in orange) and, given the observed values of similarity between our P we consider that they are evenly dispersed around a mean G and consider W as a good representation of the ancestral population. Thus, we assure acceptable levels of type I errors. The drift tests as proposed by (Ackermann and Cheverud, 2000) evaluate two main aspects of the proportionality between B and W : **III** the proportion of variance in each PC, **IV** which is tested through a regression test in logarithmic scale of B variance and W PCs; and **V** through the projection of descendant means in W PC spaces followed by a **VI** correlation test between means scores on each pair of PC.

3.3 Results

5

Drift test

A summary overview of both methods applied to test genetic drift is reported by node in Figure 3.3. Results from both regression and correlation tests suggest that the null scenario of random evolution is not a sufficient explanation to Strepsirrhini cranial evolution. We rejected drift using both methods in all more inclusive nodes (71-76). These nodes represent divergence in family level or above, such as Lemuridae (nodes 112 and 113), and up to genus level Eulemur (node 114), Indri (node 100), and between Avahi and Propithecus node 107. For Lorisidae (134) drift was rejected only in the regression test. For Cheirogalidae only the correlation test rejected drift (nodes 77-80). The divergence between Lorisioidea families (Galagidae and Lorisidae, node 131) did not rejected drift in any test. Above the genus level, we reject drift by the regression method in Eulemur (114, 115), Lepilemur (96) and in Pro-
pithecus (107).

10

15

Most part of rejections are detected up to the family level or genus, while the divergence among means in more terminal nodes can be described by random processes. The smaller the number of taxa involved in the estimation of variance in B , the higher the chance of Type II errors. Thus, we focus the fol-

lowing discussion around more inclusive nodes in the phylogeny. These nodes represent main cladogenesis events and have less uncertainty around the estimation of **B** eigenvalues. These nodes are the following: node 71 (Prosimians: Strepsirrhini primates x Tarsiers), node 73 (Strepsirrhini: Lorisiformes x Malagasy primates), node 74 (Malagasy primates: Daubentonidae x Lemuriformes), node 75 (Lemuriformes, with the four main families), node 78 (Cheirogaleidae – node 77 x Lepilemuridae –node 88) and node 99 (Indridae –node 100 x Lemuridae –node 112). Furthermore, all these nodes have Bayesian posterior probabilities above 0.95 (Herrera and Davalos, 2016) and thus have low levels of uncertainty related to topology.

Figure 3.2 – Deviations from neutrality detected by node in the phylogeny obtained from Herrera and Davalos (2016). We only applied the tests in nodes involving more than 4 taxa, as indicated by the circles. Nodes without circles were not tested. Illustrations represent main genus by family (illustration credits: J.L.Barbosa, published with permission).

Regression test

Regressions for the main 13 nodes are represented in Figure 3.3. We rejected drift in 9 nodes, and when PC1 was removed, we rejected drift in 7 out the 13 main nodes. In both cases we rejected drift in the more inclusive nodes (71,73,74 and 75), as well as for Lemuridae and Indridae divergence and respective families nodes. The node representing the divergence between Cheirogaleidae and Lepilemuridae we rejected drift only when PC1 was accounted in the regression and the same was observed for the node between Nycticebus and Loris divergence. For the Cheirogaleidae, Lepilemuridae, and Lorisidae nodes we did not reject drift in any case (neither considering or excluding PC1). A complete summary of regression tests applied in all tested nodes with and without PC1 is reported in Table 3.1.

Figure 3.3 – Regression test results for the 13 main nodes of the Strepsirrhini phylogeny. Colored full lines are the observed regression considering all PCs; dotted lines are the observed regressions excluding PC1. Black lines are the reference identity line. Lines in red we rejected drift and in green we did not reject drift. Plotted numbers make reference to the PCs Regressions for Numbers in the simplified version of the current taxonomy make reference to nodes in Figure 3.2.

We calculated the amount of variance associated with each of the 10 first PCs of **B** and **W**, and its relative proportion as the ratio between each PC variance and the sum of total PCs variance. Given that

B matrices are obtained from the variance between scores of species multivariate means projection in **W** PCs, we did not expected their proportion of variances to be ordered from higher to lower proportions as **W**. The displacement of variance among the first 10 PCs of **B** in all more inclusive nodes (71-76) presented a congruent pattern (Figure 3.4). This congruent pattern is a increase in variance of all first ten PC in the majority of **B**, PC2 and 3 of both matrices with similar variances and followed by two other peaks in PCs 4 and 8. In the Lemuridae x Indridae divergence we see a similar pattern (high PC1, 4 and 8) and also in Indridae nodes (high PC1 and 4) (Figure 3.4). The three nodes that represent Lorisiformes divergences showed higher levels of variance only in PC1. Interestingly, the only exception of high variance in **B** PC1 in all main nodes family was Lepilemuridae, which also has a very similar distributed variance along all the PCs of **W**. In general all **B** showed 3.22 times more variation concentrated in PC1 than **W** (Figure 5.7 (SI). The highest being Cheirogaleidae with (3.88), and the lowest Lepilemuridae with 3 times). In some nodes, PC2 showed very similar proportions in **B** and **W**, such as Lepilemuridae, Indridae and all Lorisiformes nodes. In general, the remaining PCs showed considerable proportionally less variation than PC1 in **B** then in **W**, with some exceptions: Lepilemuridae PCs 3, 4 and 8; Indridae PCs 2, 4, 5, 7 and 9; Lemuridae x Indridae PCs 4 and 8; and finally Lepilemuridae x Cheirogaleidae PCs 7,8 and 10.

Figure 3.4 – Distribution of variance in the first 10 principal components expressed in proportion for **B**, **W** and **W**. Numbers in the simplified version of the current taxonomy make reference to nodes in Figure 3.2.

3.3 Results

Table 3.1 – Summary of regression tests applied by node. Empirical intervals of confidence (IC-: lower and IC+: upper) obtained for the slope (β) of regression between variance in **B** and **W** in a logarithmic scale. $_{-PC1}$ represent values obtained for the regression without PC1.

Node	IC-	β	IC+	Ho	IC- $_{-PC1}$	β_{-PC1}	IC+ $_{-PC1}$	Ho $_{-PC1}$
135	0.88	1.13	1.38	Not Rejected	0.80	1.07	1.34	Not Rejected
134	1.07	1.25	1.44	Rejected	1.00	1.19	1.39	Not Rejected
132	0.92	1.07	1.22	Not Rejected	0.86	1.01	1.16	Not Rejected
131	0.98	1.12	1.27	Not Rejected	0.91	1.06	1.21	Not Rejected
127	0.95	1.15	1.34	Not Rejected	0.90	1.11	1.33	Not Rejected
126	0.85	1.07	1.28	Not Rejected	0.75	0.96	1.18	Not Rejected
125	0.89	1.11	1.33	Not Rejected	0.80	1.03	1.26	Not Rejected
118	0.61	0.85	1.08	Not Rejected	0.62	0.87	1.12	Not Rejected
117	0.73	0.94	1.16	Not Rejected	0.67	0.90	1.13	Not Rejected
116	0.84	0.99	1.14	Not Rejected	0.80	0.97	1.14	Not Rejected
115	1.04	1.19	1.34	Rejected	0.98	1.14	1.30	Not Rejected
114	1.02	1.14	1.27	Rejected	0.95	1.07	1.20	Not Rejected
113	1.04	1.22	1.40	Rejected	0.96	1.16	1.35	Not Rejected
112	1.08	1.25	1.42	Rejected	1.01	1.18	1.36	Rejected
107	1.02	1.21	1.41	Rejected	0.98	1.19	1.40	Not Rejected
106	0.96	1.12	1.29	Not Rejected	0.92	1.10	1.28	Not Rejected
105	1.01	1.17	1.33	Rejected	0.97	1.14	1.32	Not Rejected
102	0.64	0.87	1.10	Not Rejected	0.59	0.84	1.09	Not Rejected
101	1.15	1.34	1.53	Rejected	1.05	1.24	1.43	Rejected
100	1.16	1.34	1.51	Rejected	1.08	1.24	1.41	Rejected
99	1.14	1.30	1.46	Rejected	1.08	1.24	1.40	Rejected
96	0.54	0.70	0.86	Rejected	0.61	0.77	0.93	Rejected
93	0.74	0.98	1.22	Not Rejected	0.65	0.90	1.15	Not Rejected
92	0.94	1.11	1.27	Not Rejected	0.87	1.04	1.20	Not Rejected
89	1.00	1.12	1.24	Not Rejected	0.95	1.08	1.20	Not Rejected
88	0.97	1.09	1.20	Not Rejected	0.93	1.05	1.17	Not Rejected
82	0.84	1.10	1.36	Not Rejected	0.77	1.05	1.33	Not Rejected
81	0.78	0.96	1.14	Not Rejected	0.73	0.93	1.12	Not Rejected
80	0.99	1.19	1.39	Not Rejected	0.88	1.08	1.27	Not Rejected
79	0.98	1.16	1.35	Not Rejected	0.88	1.06	1.24	Not Rejected
78	0.88	1.09	1.30	Not Rejected	0.76	0.95	1.14	Not Rejected
77	0.89	1.10	1.30	Not Rejected	0.77	0.97	1.16	Not Rejected
76	1.03	1.21	1.38	Rejected	0.94	1.11	1.27	Not Rejected
75	1.19	1.35	1.51	Rejected	1.11	1.26	1.42	Rejected
74	1.16	1.31	1.46	Rejected	1.08	1.22	1.37	Rejected
73	1.15	1.28	1.42	Rejected	1.07	1.20	1.33	Rejected
71	1.11	1.24	1.38	Rejected	1.03	1.16	1.29	Rejected

In order to evaluate the proportion of total variance in **B** and **W** calculated the ratio between the trace of **B** and the trace of **W** Figure 3.5. The trace of a matrix is the sum of its diagonals. The relative proportion between each log variance of the first 10 PCs of **B** and **W** in main nodes of the phylogeny is represented in page 87 (SI).

Figure 3.5 – Ratio between trace of B and trace of W in all tested nodes. In gray are nodes in which we rejected drift. Nodes with no value reported were not tested.

Correlation test

Results from correlation test are reported in Figure 3.6 as a matrix representation of observed and Bonferroni corrected p -values. From this tests we also detected a current pattern in PCs correlation in the 4 more basal nodes (71-75). This pattern describes the correlation between the same set of PCs: 1-3, 3 and 7, 4-7, [(8 and 9)-(1-3,6)] and (8 and 9). In nodes that describe the divergence between families we detected sub-sets of this major pattern. Interestingly, the pattern of correlation between PCs 1 to 3 is maintained in all these basal nodes, and in the nodes of the families ae and Indridae families, while only PCs 1 and 3 in Lemuridae is detected and no correlation at all between the first 10 PCs of Lemuridae. Interestingly, we detected a correlation between PC 1 and 4 only in the Indridae family. We did not rejected drift in any node inside Lorisiformes lineage family, and the test could not be performed inside Galagidae because of reduced taxa representation in our sample.

Figure 3.6 – Summary of first ten PCs results from correlation drift test applied at the main nodes of the phylogeny. In grey are the not significant correlations, in red positive significant correlations, and in blue the negative significant correlations. In lower triangles are the original p values and in upper triangles the corrected values. We report here only results from the first 10 PCs. Numbers in the simplified version of the current taxonomy make reference to nodes in Figure 3.2.

PCs interpretation

To better understand the patterns rising from both regression and correlation tests we interpreted the first four PCs of our **B** and **W** matrices. First we evaluated each species and our ancestral **W** traits loadings in PC1. Combined with this evaluation, we projected each species multivariate mean in **W** morphospace. Our results showed that loadings in PC1 have the same direction or, if not, much close to zero (Figure 3.8). A similar pattern was observed in **W**, as represented in the wireframes of Figure 3.7, and detailed in Table 5.3. We also compared all species first 4 PC **P** matrices with the isometric vector. This vector is of same length as the number of dimensions of the **W** matrix (n_d), and all loadings equal to $(1/\sqrt{n_d})$. Thus, it represents a direction of variation that affects all traits with same intensity. Species PC1 were highly correlated with the isometric vector on the vast majority of species, but sometimes it was PC2 that was more aligned with the isometric vector (Figure 5.6 – SI). Thus, PC1 can be interpreted as an allometric direction of variance that represent both cranial size and shape variation. Furthermore, the extremes of PC1 axis are occupied by the larger Indri and Varecia on the right

extreme, and the tiny *Microcebus* on the lower left Figure 3.8. As for PC2, species score Species in this axis ranged from more globular vaults like the Tarsiers to more flat one like *Varecia*. PC3 is a contrast between the rostrum length combined with an increase of posterior part of occipital bone versus the curvature and of the cranial vault, ranging from the extremely more short rostrum and globular vaults like *Avahi* to more elongated rostrum and low encephalized *Varecia*. PC4 is a contrast between the oral and zygomatic region with basicranium and vault, that represent a coordinate relation between snout length and relative width of zygomatic arch relative to orbit plane, ranging from *Daubenton* that have short rostrum and wider zygomatic arch positioned right under the ocular plane. *Varecia*, which has pronounced elongated and slim rostrum and more laterally and posterior orbital plane, ranging from *Daubenton* to *Varecia*. Interestingly, PC4 separates the two families of Malagasy primates Lemuridae and Indridae, as well as *Daubentoniidae*. This are the largest members, while the smallest members of this lineage such as *Cheirogaleidae* and *Lepilemuridae* families showed little dispersion in this axis.

Figure 3.7 – Traits' scores at ancestral matrix (W) PCs 1 to 4. Values are represented by color using *Hapalemur griseus* frame, the species that best represent the mean shape of extant Strepsirrhini

Figure 3.8 – Biplots of all species means (points) projected in combinations of PC1xPC4 of Strepsirrhini ancestral W. Colors represents the main families and shapes represent the infraorder Lorisiformes (Out of Madagascar) and the endemic primates from Madagascar. From left clockwise, cranium represent *Microcebus*, *Lepilemur*, *Indri* and *Varecia* genera.

3.4 Discussion

Results emerging from our analyses indicate that for more deep nodes of the Strepsirrhini phylogeny, the variance of cranial multivariate means is much more divergent to be explained only by random evolutionary processes like drift. However, in more shallow nodes the pattern of phenotypic divergence is consistent with drift [Figure 3.2](#). If drift alone is the main process responsible for divergence, we expect the amount of variance associated with each PC of **B** to be proportional to those in **W**. In this case, in [Figure 3.4](#) we would see both lines representing **B** and **W** to run parallel along the x axis. If selection, on the other hand was responsible for divergence, we expect that some PCs in **B** will have disproportional distribution of variance when compared to **W**. Thus, an increase in a particular **B** PCs variance may indicate directional selection, while a decrease may indicate stabilizing selection on the other way around. Thus, results obtained from the ratio between the trace of **B** and trace of **W** ([Figure 3.5](#)) suggest that directional selection was the main process responsible for Strepsirrhini cranial evolution.

The observed results from both regression and correlation tests indicate congruent patterns for all more deep nodes representing the Malagasy lineage diversification until family level (nodes 71-75). This congruent pattern is clearly show in [Figure 3.4](#), with higher variances in **B** PCs than in **W** in these nodes, and a substantial increase (> 3 times) of relative variance associated with PC1, which represents size. This results suggest that the Malagasy primates cranial morphology diverged by a strong influence of size in all but Lepilemuridae family. Interestingly, substantial part of this congruent more basal pattern is maintained up to genus level in Indridae and Lemuridae families, while it is absent in Cheirogaleidae and Lepilemuridae families. This result can be interpreted in the light of species scores in PC1 [Figure 3.8](#), in wich on the left side are represented the small bodied Cheirogaleidae and Lepilemuridae families and on the right the Larger bodied Lemuridae and Indridae families. As for the Lorisiformes lineage more specifically, we only rejected drift in the Nycticebus vs. Loris genera divergence thought regression test when considering PC1. Thus, we may argue that the Malagasy primates showed more signals of phenotypic cranial evolution related with selective processes when compared to its sister clade Lorisiforms. The Lorisiforms are a much less diverse clade ([Herrera and Davalos, 2016](#)), but are also the less studied primates ([Nekaris and Bearder, 2007](#)). Thus, this result must be carefully evaluated given that our sampled species may not reflect the complete range of phenotypic variation in this lineage. From now on we will focus our discussion around the Malagasy lineage main nodes, given that our sample accounts for more that 60% of all recognized species to date ([Mittermeier et al., 2010](#); [Yoder, 2012](#)).

Each PC is a linear combination of traits that can not be automatically assumed to represent genetically independent features ([Berner, 2012](#)). The ortogonalization process to which matrices are subjected to extract the PC axes is not a property of genetic architecture ([Berner, 2012](#); [Blows, 2007](#); [Brodie and McGlothlin, 2007](#); [Cheverud, 2007a](#)). Thus, the simple interpretation of such mathematical oper-

ation as biologically meaningful suffers from potentially flaws (Berner, 2012; Blows, 2007; Brodie and McGlothlin, 2007; Cheverud, 2007a), and must be carefully done. Thus, we evaluated each PC extremes and interpreted the scores of projected species in **W** (Figure 3.8), according to anatomical features related with the contrasts in loadings (Figure 3.7) to seek for a biological interpretation. We focused on

5 PC1 to PC4 because summed they account for more than 0.7 of total variance in **W**. Thus, they allow us to describe the main directions of the morphospace occupied by Strepsirrhini cranial diversification.

From the comparison between variance associated with first 10 PC in **B** and **W** matrices, we detected significant contribution of PC1 to the observed divergence in cranial means. Furthermore, PCs 2, 3 and 4 also contributed to observed deviations from neutrality. As seen in correlation tests, PCs 1, 2

10 and 3 showed a strong signal of co-selection Figure 3.6. This indicates that phenotypic divergence had favored the association between this three main directions of the morphospace during the early evolutionary history of Strepsirrhini clade (nodes 71-75). More interestingly, our results showed six main shifts in the amount and in the combination of variance associated with the first 4 PCs that describe the rise of the four Lemuriformes families. 1.) Size was the main factor contributing to the divergence

15 between Cheirogaleidae and Lepimemuridae families; in which 2) Cheirogaleidae display the highest levels of variance associated with size (relatively > 90%, comprehending and 3.88 times higher than in **W**), while 3.) Lepilemuridae cranial morphology divergence can be explained by drift alone, and can be considered more similar to the ancestral Strepsirrhini; 4) increased variance in PC1 together with a shift between PC1 correlation with PCs 2 to 4 may explain the divergence between Lemuridae and

20 Indridae families, in which 5.) Lemuridae showed significant co-selection between PC1 and PC3, while in 6.) Indridae there is a strong and significant signal of co-selection between PC1 to PC3 and PC1 with PC4.

This is not the first study to report extreme high levels of variance associated with PC1 in Cheirogaleidae (Groeneveld et al., 2011; Lei et al., 2014). Masters et al. (2014) evaluated the evolution of body size in

25 Malagasy primates in an ontogenetic framework comparing allometries of juvenile Lepilemuridae with static allometries of adult Cheirogaleidae. They showed that Cheirogalidae lineage have pedomorphic features in cranial traits, and display characters found in other juvenile lemurs such as shorter limbs, cranial volume and cheek to molar lengths. These authors showed that the pedomorphic features are more pronounced in the smaller taxa, and suggest that Cheirogaleidae have a shorter and truncated de-

30 velopment (progenesis), probably the responsible for their dwarfism. Furthermore, they argue that this family experienced at least four independent events of body size reduction, and that the ancestor malagasy primate was as large as living folivorous Lepilemuridae genus (Masters et al., 2014). The members of Cheirogaleidae display the most diverse feeding behaviors of Malagasy primates, specialized in insects, gums and exudates diets (Mittermeier et al., 2010; Wright, 1999). Génin et al., 2010;

35 Montgomery and Mundy, 2013; Vinyard et al., 2003 suggested that, like the small bodied NWM cal-

litrichines, dwarfism in Cheirogaleidae is a convergence in primate body size evolution, probably related with unpredictable environments (Martin, 1992). Gums and tree exudates are available all seasons, even in the absence of fruits, leaves and insects (Mittermeier et al., 2010; Wright, 1999). In cranial trait evolution, NWM differentiation among occurred along allometric lines (Marroig and Cheverud, 2005), as following the the axis of more amount of variance, or line of least evolutionary resistance as proposed by Schluter (1996). Although, this might not be the only direction of considerable divergence among Malagasy exquisite primate radiation. 5

From Figure 3.8 it becomes more clear that the divergence among the large bodied families Lemuridae and Indridae occurred mainly along PC4. While all Indridae species are strictly folivorous, the majority of Lemuridae members are frugivorous or feed on a mixed diet combined with leaves. The only exceptions are the Bamboo lemurs (Haplemur and Prolemur genera), which are specialized in the ingestion of toxic bamboo (Mittermeier et al., 2010). Interestingly, in Figure 3.8 we can see that Prolemur falls within Propithecus species, which feed mainly on leaves (Mittermeier et al., 2010). Thus, PC4 may reflect the anatomical features related to diet, and not only phylogenetic distance. Baab et al. (2014) investigated the cranial shape evolution of lemurs accounting for the relationship between phylogeny, ecological and allometric factors. They showed that when phylogeny is accounted, only more common diet (leaves, fruits, gum or insects) accounted for more significant proportions of shape variation. Here we confirm these authors suggestion that few dietary shifts combined with body size may explain the divergence of the Malagasy lemurs (Baab et al., 2014). Through a phylogenetic framework (Fedorman et al., 2016) examined Malagasy extant and extinct primates diet evolution, and inferred the independent evolution of folivory between one and five times. Furthermore, Kamilar and Muldoon (2010) evaluated niche diversity in Malagasy primates and showed that only Indridae has a phylogenetic signal with ecological factors and suggest that this family might have experienced neutral climatic divergence. 10 15 20

Dietary advantage hypothesis have being described to explain the trade-offs between mechanical advantages and wide gaps (Herring and Herring, 1974; Hylander et al., 2005; Vinyard et al., 2003). Two main diet strategies are commonly recognized: great mechanical advantage related with strong bite and chewing, and wide gapes related to large ripe fruits. Associated with each of these strategies are cranial adaptations like a temporomandibular joint more aligned with occlusal plane for strong bites; and longer jaws combined with an anteroposteriorly elongated glenoid fossa related to wide gapes (Baab et al., 2014; Herring and Herring, 1974; Vinyard et al., 2003). Diet is reflected in anatomical features (Kirk, 2006; Meloro et al., 2015; Scott, 2012; White, 2009), and can be recognized in W PC4. Thus, we may argue that this contrast between the oral and anterior zygomatic plate traits with more posterior zygomatic and neurocranium may be under directional selection. 25 30

Some authors proposed alternative evolutionary quantitative methods to investigate the consequences of genetic constraints emerging from the distribution of variance in **G** that does not involve 35

diagonalization (Hansen and Houle, 2008; Marroig et al., 2009). These methods are based in simulating a large set of random selection vectors in order to measure a Matrix ability to respond. The Malagasy primates display an impressive range of sizes, specially considering the recently extinct forms (Bennett and Goswami, 2012; Fleagle et al., 2010; Godfrey and Jungers, 2003; Mittermeier et al., 2010). Given that
5 our results suggest natural selection as an evolutionary process contributing to the divergence between means, we can estimate selection gradients and evaluate species magnitudes of response to selection and its alignment with the adaptive landscape.

4 Conclusões e Perspectivas futuras

"Our best hope of understanding correlated evolution and other patterns may lie with analytical tools that use two powerful multivariate concepts: the adaptive landscape and the G-matrix"

Arnold et al. (2008)

5

Durante este projeto, utilizei matrizes de variância e covariância de caracteres cranianos de espécies de primatas da subordem Strepsirrhini como modelo para elucidar a evolução da linhagem em um contexto macroevolutivo sob a perspectiva da genética quantitativa. Por ser um estudo empírico envolvendo espécies selvagens, essa dissertação se insere no contexto da de genética quantitativa comparativa e contribui para o entendimento da estabilidade da Matriz **G** ao longo do tempo, tema que ainda é foco de extensos debates na biologia evolutiva. Os principais resultados obtidos indicam que há relativa estabilidade no padrão de variância apresentada nesta linhagem e que existe forte influência de distância filogenético entre as espécies no grau de similaridade apresentado por suas matrizes. Além disso, a homogeneidade nos valores de similaridade com as matrizes **G** e **P** de *Saguinus fuscicollis* são um forte indício de que os principais padrões de variância presentes em **G** são refetidos naqueles expressos em **P**. De acordo com os valores de similaridade altos entre as matrizes ancestrais, podemos inferir que tais padrões se mantiveram relativamente estáveis ao longo da diversificação dos primatas. Essa manutenção na estrutura geral de variância pode ser explicada em parte por padrões de seleção estabilizadora comuns ao clado. Verificar o padrão estrutural de matrizes deve ser o primeiro passo para a aplicação dos modelos de genética quantitativa aos estudos de evolução morfológica.

10

15

20

A partir dos resultados do [section 2](#) que indicam estabilidade da **G** dos Strepsirrhini, pudemos aplicar os modelos de genética quantitativa para avaliar a evolução craniana nos Strepsirrhini. As análises aplicadas testaram a hipótese nula de que a quantidade de variação apresentada entre e dentro da linhagem dos Strepsirrhini se manteve proporcional ao longo da diversificação da linhagem. Constatamos que a divergência na evolução das médias multivariadas craniâneas apresenta uma quantidade de variação que não pode ser explicada apenas por processos aleatórios como deriva genética. Detectamos que há indícios de ação de seleção contribuindo para a divergência entre as médias das espécies desta linhagem em diversos pontos da filogenia, principalmente nas porções mais basais. Nossos resultados sugerem que tais assinaturas de seleção estão alinhados com evolução relacionada a tamanho e no nível família podem ser relacionadas com pontos de mudanças de dieta. Nestes pontos de mudança de dieta também detectamos forte padrão de seleção para morfologias que parecem estar relacionadas com ótimos adaptativos para dieta de folivoria e frugivoria.

25

30

Mas como se deu a evolução desse grupo de primatas que filogeneticamente são os mais distantes dos humanos? Os Lemuriformes, ao lado do Aye-aye, foram os únicos primatas não-humanos cujo ancestral colonizou Madagascar. Com apenas 7% da área do Brasil, Madagascar é a quarta maior ilha

35

do mundo e o segundo país em diversidade de espécies de primatas. Este clado endêmico a ilha apresenta ampla diversidade de padrões de atividade e de locomoção, estrutura social, tamanho corpóreo e forma. Além disso, atualmente a ilha apresenta quatro principais zonas climáticas bastante distintas, de forma que muitos estudos apontam esse clado como um exemplo de radiação adaptativa. A partir dos resultados deste projeto saímos com algumas perguntas respondidas, mas é partimos para uma próxima capazes de elaborar perguntas complementares para melhor elucidar a evolução dos primatas de Madagascar. As famílias com representantes de maior tamanho corpóreo encontram-se distribuídos em florestas tropicais úmidas. Será que existe uma relação entre o tamanho das espécies e seus respectivos fatores climáticos? Quanto aos demais componentes ecológicos como dieta e padrão de atividade, diversos autores exploraram sua relação com morfologia controlando para o efeito filogenético entre eles. Mas se filogenia, dieta e distribuição estão bastante relacionados, qual a contribuição de cada um desses fatores para aspectos morfológicos? Detectamos sinal de seleção em diversos pontos da filogenia. Mas qual foi o alinhamento entre as respostas evolutivas e as pressões de seleção? Qual a intensidade e alinhamento desta seleção?

O próximo passo para responder a estas questões será abordar a estrutura modular apresentada entre os caracteres que compõe o crânio, relacionando os sinais de seleção detectados no Capítulo 2 com aspectos biomecânicos subjacentes aos principais eventos de mudança e especialização de dieta. A partir de agora a amostragem do LEM contempla a diversidade total de gêneros da ordem Primates e poderemos investigar a evolução da modularidade em primatas em um contexto filogenético mais amplo. Como vem sendo proposto pela equipe do LEM (metodologia descrita em [Porto et al., 2009](#)), o padrão de Integração (modularidade) observado é comparado com matrizes teóricas de relacionamento entre os caracteres. Essas matrizes teóricas foram elaboradas a partir de hipóteses funcionais e de desenvolvimento e podem ser utilizadas para testar a integração entre duas regiões principais do crânio: Neurocrânio e a Face; além de cinco outras sub-regiões: oral, zigomático, nasal, base e abóbada craniana.

[Hansen and Houle \(2008\)](#) chamaram a atenção ao fato de que a maior parte dos métodos aplicados na comparação e caracterização de matrizes de variância e covariância não havia sido derivado de um contexto teórico explícito. Dessa forma, partindo da equação de resposta multivariada à seleção de Lande, esses autores e [Marroig et al. \(2009\)](#) propuseram algumas métricas capazes de avaliar a habilidade dessas matrizes permitirem ou restringirem a evolução em determinadas direções do morfoespaço. Dentro desse contexto podemos combinar a paisagem adaptativa e partir de uma perspectiva filogenética para estimar caracteres ancestrais e calcular as direções e forças de seleção necessárias para produzir a diversidade presente na linhagem dos Strepsirrhini. Os Strepsirrhini apresentam uma diversidade de formas recentemente extintas que superam o extremo da variação da diversidade vivente

[Figure 4](#). Coletei dados morfométricos de subfósseis lêmures ([Table 4.1](#)) e pretendo incluí-los nestas

análises.

Figure 4.1 – Biplot PC1 x PC4 com toda a diversidade de primatas Strepsirrhini fósseis e vivos que compõe minha amostra. Representações de crânio e mandíbula correspondem, em sentido horário, aos gêneros Varecia, Microcebus, Daubentonia, Hadropithecus (extinto) e Megaladapis (extinto).

Table 4.1 – Amostra de subfósseis de Madagascar.

Espécie	n amostral
Palaeopropithecus sp.	2
Babakotia radafolia	2
Mesopropithecus sp.	3
Archaeolemur edwardsi	12
Archaeolemur majori	2
Hadropithecus sp.	1
Pachylemur jullyi	3
Megaladapis sp.	5

5 Apendice

5.1 Chapter I

About the samples

Microcebus griseorufus sample consist of a population collected by Hans Bluntschi in a gap of 3 months
 5 between October and November 1931 in South Amboasary forest. This sample was cautiously study by
 (Cuozzo et al., 2013), where all the individuals were cassified as *M. griseorufus* based on dental charac-
 ters.

Prolemur simus sample consist of museum specimens found in old cave deposits, some of which
 with broken parts, and consequently some missing values for some specimens traits. This might affect
 10 variance estimation in some directions because error can influence them in different ways.

Traits repeatabilities were calculated in order to estimate measuring errors following Lessells and
 Boag (1987). The density plot show that the vast majority of traits per species showed values higher
 than 0.9.

Figure 5.1 – A repeatability calculated for each trait by specie following Lessells and Boag (1987) showed values larger than 0.9 and coefficient of variation lower than 0.25 for more than 95% of all traits by species. Thus the quality of measurements are reliable for variance estimates.

Matrix estimation and similarity

15 **Sexual dimorphism effect** We performed ANOVA for each trait and Manova for species with sample
 sizes larger than 41 (in the case of 39 dependent variables and two categories for the sex factor, the

number of ranks must account the lost of 2 df). The only species with significant p-values using a multivariate model was the tiny *Microcebus griseorufus* section 5.1. We performed a set of comparisons between estimated matrices for each sex separately (Males and Females), combined (Raw data), and using the residuals of the model of a regression accounting for the sex effect (Sex Fit). All comparisons where > 0.84 . This value is higher than the average obtained from a rarefaction analysis applied to the whole set of individuals for the respective sample size (33) Figure 2.2. Other species of the same genus did not showed significant values (*M. rufus* $p = 0.2256$).

Besides that, even species with enough sample sizes for both sexes for which are reported some level of sexual dimorphism regarding size (Tennenhouse, 2015) showed no significance (e.g. section 5.1). Controlling for sex effect in samples with lack of information would reduce the number of individuals represented by the residuals of multivariate models, and if using univariate models for species traits with significant effect of size would drive to differences in the representation of observed variance. Hence matrices were estimated from raw distance data for all species in order to maintain the criteria to estimate phenotypic matrices.

Table 5.1 – P-values for multivariate models for sex effect on euclidean distances. Models were performed for species with complete information about sex and sample sizes larger than 41. Reported p values were obtained from a Type III MANOVA Tests and Wilks test statistic.

Specie	p
<i>Microcebus griseorufus</i>	0.0086
<i>Microcebus murinus</i>	0.2256
<i>Eulemur albifrons</i>	0.2609
<i>Eulemur collaris</i>	0.5854
<i>Eulemur rubriventer</i>	0.3306
<i>Eulemur macaco</i>	0.7504
<i>Perodicticus potto</i>	0.7785
<i>Galago senegalensis</i>	0.1689

Figure 5.2 – Upper triangle reports the RS and at lower triangle are the KRZ comparison values. The matrices can be considered high similar.

Matrix repeatabilities calculated via Monte Carlo and Bootstrap are estimates of sample errors associated with P-matrix estimate. It gives a measurement of how similar a matrix re-sample is to the original matrix. This procedure was performed 1000 times through bootstrap resample and via Monte Carlo, simulating a distribution of same variance and mean as the original matrix. The matrices were compared using RS and KRZ methods these repeatabilities distributions by matrix are an estimate of the highest levels of similarity expected for a particular matrix. The vast majority of matrices showed values higher than between 0.8 0.9, thus all P matrix estimates are reliable to proceed with matrix comparisons.

Table 5.2 – Matrix repeatabilities (REP) calculated via Monte Carlo (MC) using Random Skewers (RS) and Krzanowski (KRZ) methods of comparison. Sample sizes for each species in n , and detailed by sex (♀, ♂ and U – undefined). Mean raw values of comparison ($\bar{s}$) are reported by method (RS and KRZ).

Species	Rep RS	Rep KRZ	n	♀	♂	U	$\bar{s}$ (RS)	$\bar{s}$ (KRZ)
Tarsius bancanus	0.828	1.000	19	10	6	3	0.600	0.620
Tarsius syrichta	0.880	0.886	28	17	9	2	0.520	0.671
Microcebus griseorufus	0.934	0.877	68	34	32	2	0.651	0.750
Microcebus murinus	0.921	0.883	62	14	29	19	0.717	0.747
Mirza coquereli	0.889	0.918	22	7	7	8	0.655	0.688
Cheirogaleus major	0.918	0.880	32	6	14	12	0.693	0.754
Cheirogaleus medius	0.934	0.889	43	13	11	19	0.708	0.754
Phaner furcifer	0.904	0.957	18	3	7	8	0.602	0.669
Lepilemur ruficaudatus	0.895	0.880	38	4	8	26	0.717	0.742
Lepilemur leucopus	0.889	0.883	34	19	8	7	0.663	0.731
Lepilemur mustelinus	0.881	0.931	21	9	9	3	0.640	0.685
Avahi peyrierasi	0.848	1.000	19	10	6	3	0.621	0.646
Avahi laniger	0.913	0.880	38	9	14	15	0.652	0.748
Propithecus coronatus	0.842	0.900	17	3	6	8	0.598	0.650
Propithecus deckenii	0.843	0.936	21	7	10	4	0.672	0.698
Propithecus verreauxi	0.933	0.893	58	21	19	18	0.662	0.734
Propithecus diadema	0.922	0.881	43	13	12	18	0.697	0.763
Propithecus edwardsi	0.893	0.900	28	6	7	15	0.683	0.710
Indri indri	0.922	0.913	59	19	23	17	0.706	0.757
Eulemur albifrons	0.951	0.903	63	23	37	3	0.713	0.777
Eulemur fulvus	0.938	0.891	52	14	19	19	0.755	0.763
Eulemur rufifrons	0.917	0.904	25	8	13	4	0.681	0.737
Eulemur rufus	0.919	0.881	43	17	18	8	0.737	0.773
Eulemur cinereiceps	0.909	0.920	22	12	9	1	0.596	0.700
Eulemur collaris	0.945	0.891	56	19	27	10	0.731	0.771
Eulemur mongoz	0.944	0.888	51	17	12	22	0.692	0.761
Eulemur rubriventer	0.937	0.891	52	22	23	7	0.667	0.761
Eulemur coronatus	0.889	0.899	25	7	16	2	0.668	0.728
Eulemur macaco	0.947	0.889	55	25	22	8	0.697	0.755
Hapalemur griseus	0.923	0.898	57	24	17	16	0.680	0.775
Prolemur simus	0.864	0.899	28	2	1	25	0.594	0.655
Lemur catta	0.936	0.886	56	13	29	14	0.732	0.779
Varecia rubra	0.862	0.947	18	8	9	1	0.617	0.675
Varecia variegata	0.941	0.892	62	21	19	22	0.721	0.777
Daubentonia madagascariensis	0.910	0.879	32	5	12	15	0.545	0.726
Perodicticus potto	0.948	0.895	55	17	27	11	0.665	0.765
Loris tardigradus	0.906	0.817	15	5	7	3	0.577	0.686
Nycticebus coucang	0.924	0.898	31	16	12	3	0.674	0.712
Euoticus elegantulus	0.867	0.818	15	5	7	3	0.383	0.643
Otolemur crassicaudatus	0.920	0.890	26	10	14	2	0.610	0.698
Otolemur kirkii	0.934	0.889	33	12	21	0	0.645	0.717
Galago senegalensis	0.937	0.893	58	29	29	0	0.612	0.739

Raw values of comparison via Krzanowski and Random Skewers

Figure 5.3 – Raw values of comparison for each pair of species' Variance/Covariance matrix between two methods: Random Skewers at upper triangle using 1000 random vectors and Krzanowski at lower triangle. Sample sizes per species are reported at diagonal. Colors represent the range of value of comparison, from high values in red to lower values in blue. In the upper triangle, values written in white are not significant, meaning that the probability of the association between the two compared matrices is lower than the expected distribution of random vectors.

Corrected repetabilities Species matrices comparisons via Krzanowski and Random Skewers

Figure 5.4 – Corrected values of comparison using each species repeatability calculated using Monte Carlo. **Random Skewers at upper triangle** and **Krzanowski at lower triangle**. Sample sizes per species are reported at diagonal and matrices repeatabilities are reported in page 81. Colors represent the range of value of comparison, from high values in red to lower values in blue. In the upper triangle, values written in white are not significant, meaning that the probability of the association between the two compared matrices is lower than the expected distribution of random vectors.

Figure 5.5 – Variance/Covariance matrices comparisons by species using two methods of comparison. **Random Skewers at upper triangle** and **Krzanowski at lower triangle**. All values of comparison reported are corrected following (Steppan, 1997), taking into account each pair of matrix sample sizes' harmonic mean, as reported in page 81. Reported values of comparison (c) are the sum between the raw value (r reported in page 83) and a correction factor: $c = r - b/\mu_h$, where b is the slope of the regression line between the comparison values and the $1/\mu_h$, the inverse harmonic mean (regression is reported in page 51). Sample sizes per species are reported at diagonal. Colors represent the range of value of comparison, from high values in red to lower values in blue. In the upper triangle, values written in white are not significant.

5.2 ChapterII

Figure 5.6 – Species matrices PC1 to PC4 absolute value of correlation with the isometric vector. Observed values of correlation is show with color scale that represent the range from low (blue) to high (red) values.

Figure 5.7 – Distribution of variance in the first 10 principal components expressed in proportion for B, W and W. Numbers in the simplified version of the current taxonomy make reference to nodes in Figure 3.2.

Table 5.3 – Strepsirrhini ancestral matrix traits'loadings on first 10 Principal Components

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
IS_PM	0.06	0.02	0.02	-0.02	0.03	0.08	0.06	-0.01	-0.02	0.11
IS_NSL	0.09	0.00	-0.04	-0.03	0.01	0.07	-0.04	0.06	-0.02	-0.02
IS_PNS	0.25	0.08	0.07	0.07	0.18	0.10	-0.00	-0.05	-0.14	0.28
PM_ZS	0.21	0.04	0.00	0.04	0.20	-0.03	-0.26	-0.10	-0.07	-0.17
PM_ZI	0.25	0.11	0.07	0.44	-0.14	-0.00	-0.14	0.05	0.03	-0.18
PM_MT	0.27	0.05	0.02	0.06	0.11	0.06	-0.12	0.07	0.14	-0.20
NSL_NA	0.14	0.23	0.41	0.08	0.39	-0.36	0.33	-0.05	0.18	0.15
NSL_ZS	0.19	0.07	0.08	0.09	0.29	-0.13	-0.35	-0.26	-0.19	0.06
NSL_ZI	0.29	0.13	0.11	0.39	-0.05	0.02	-0.06	0.02	-0.00	0.06
NA_BR	0.33	-0.63	-0.38	0.14	0.01	-0.07	0.03	-0.19	0.04	0.10
NA_FM	0.20	-0.05	-0.19	-0.02	-0.05	0.25	-0.20	0.04	0.00	0.01
NA_PNS	0.17	0.01	-0.02	-0.03	0.02	0.15	0.04	0.05	-0.11	0.22
BR_PT	0.11	-0.18	-0.00	0.05	0.09	0.13	0.36	-0.33	0.09	0.14
BR_APET	0.10	0.04	0.05	-0.11	-0.13	0.15	0.19	-0.38	0.13	0.12
PT_FM	0.15	0.04	-0.06	-0.05	0.17	0.28	0.11	0.16	-0.07	-0.10
PT_APET	0.10	0.01	0.04	-0.13	-0.24	-0.23	-0.06	-0.13	0.18	0.08
PT_BA	0.22	0.04	0.05	-0.17	-0.26	-0.22	-0.01	0.07	-0.07	0.08
PT_EAM	0.16	0.03	0.02	-0.16	-0.25	-0.25	-0.08	0.07	-0.02	0.13
PT_ZYGO	0.18	0.03	-0.00	-0.17	-0.19	-0.16	-0.06	0.17	-0.13	0.14
PT_TSP	0.06	-0.00	0.01	-0.07	-0.19	-0.23	-0.11	-0.07	0.10	0.05
FM_ZS	0.11	0.02	-0.01	-0.03	-0.09	0.10	0.22	0.18	0.29	0.01
FM_MT	0.20	0.02	0.02	-0.12	0.04	0.16	0.11	0.14	0.08	0.01
ZS_ZI	0.14	0.06	0.02	0.23	-0.25	0.14	0.30	0.28	0.19	0.02
ZI_MT	0.09	-0.01	0.02	-0.05	-0.00	0.08	0.01	0.09	0.08	-0.06
ZI_ZYGO	0.18	-0.01	-0.07	-0.47	0.28	0.02	0.03	0.11	0.00	0.01
ZI_TSP	0.14	-0.02	-0.05	-0.32	0.22	-0.02	-0.03	0.04	0.20	-0.16
MT_PNS	0.06	-0.00	0.00	0.01	-0.01	0.02	-0.02	0.01	0.15	-0.15
PNS_APET	0.15	0.02	-0.03	-0.08	0.01	-0.12	-0.07	-0.04	0.39	-0.43
APET_BA	0.13	0.03	0.01	-0.04	-0.01	0.01	0.03	0.23	-0.25	0.04
APET_TS	0.04	-0.01	0.01	-0.01	-0.03	0.00	0.01	-0.01	0.02	0.03
BA_EAM	0.12	0.02	0.05	-0.06	-0.02	0.04	0.10	0.06	-0.11	-0.01
EAM_ZYGO	0.04	-0.00	-0.04	-0.03	-0.04	-0.06	-0.08	-0.04	0.18	-0.11
ZYGO_TSP	0.12	0.03	-0.02	-0.09	-0.01	0.05	0.03	0.24	-0.19	0.09
LD_AS	0.03	-0.10	0.36	-0.12	-0.14	0.27	-0.28	-0.10	0.25	0.29
BR_LD	0.04	0.65	-0.42	-0.08	-0.11	0.23	-0.05	-0.33	0.06	0.08
OPI_LD	0.05	-0.14	0.54	-0.17	-0.20	0.35	-0.08	-0.20	-0.17	-0.27
PT_AS	0.20	0.05	-0.02	-0.11	-0.24	-0.19	0.23	-0.20	-0.33	-0.22
JP_AS	0.07	0.02	0.00	-0.01	-0.03	0.01	0.31	-0.18	-0.28	-0.37
BA_OPI	-0.01	0.00	-0.04	-0.01	-0.03	-0.04	0.08	-0.15	0.10	0.13

Bibliography

- Ackermann, R. and Cheverud, J. (2000). Phenotypic covariance structure in tamarins (genus *Saguinus*): a comparison of variation patterns using matrix correlation and common principal component analysis. *American journal of physical anthropology*, 111(4):489–501.
- Ackermann, R. and Cheverud, J. M. (2002). Discerning evolutionary processes in patterns of tamarin (genus *Saguinus*) craniofacial variation. *American journal of physical anthropology*, 117(3):260–71. 5
- Ackermann, R. and Cheverud, J. M. (2004). Morphological integration in primate evolution. *Phenotypic integration: Studying the ecology and evolution of complex phenotypes*, pages 302–319.
- Agrawal, A. F. and Stinchcombe, J. R. (2009). How much do genetic covariances alter the rate of adaptation? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 276(1659). 10
- Ali, J. R. and Huber, M. (2010). Mammalian biodiversity on madagascar controlled by ocean currents. *Nature*, 463(7281):653–656.
- Aristide, L., dos Reis, S. F., Machado, A. C., Lima, I., Lopes, R. T., and Perez, S. I. (2015). Encephalization and diversification of the cranial base in platyrrhine primates. *Journal of human evolution*, 81:29–40.
- Arnold, S. J. (1992). Constraints on phenotypic evolution. *American Naturalist*, pages S85–S107. 15
- Arnold, S. J. (2014). Phenotypic evolution: the ongoing synthesis. *The American Naturalist*, 183(6):729–746.
- Arnold, S. J., Bürger, R., Hohenlohe, P. A., Ajie, B. C., and Jones, A. G. (2008). Understanding the evolution and stability of the g-matrix. *Evolution*, 62(10):2451–2461.
- Arnold, S. J., Pfrender, M. E., and Jones, A. G. (2001). The adaptive landscape as a conceptual bridge between micro-and macroevolution. *Genetica*, 112(1):9–32. 20
- Arnold, S. J. and Phillips, P. C. (1999). Hierarchical comparison of genetic variance-covariance matrices. ii. coastal-inland divergence in the garter snake, *thamnophis elegans*. *Evolution*, pages 1516–1527.
- Asher, R. J. (1998). Morphological diversity of anatomical strepsirrhinism and the evolution of the lemuriform toothcomb. *American journal of physical anthropology*, 105(3):355–367.
- Atchley, W. (1993). Genetic and developmental aspects of variability in the mammalian mandible. *The skull: development*, 1:207–247. 25
- Baab, K. L., Perry, J. M., Rohlf, F. J., and Jungers, W. L. (2014). Phylogenetic, ecological, and allometric correlates of cranial shape in malagasy lemuriforms. *Evolution*, 68(5):1450–1468.
- Barton, N. and Turelli, M. (1989). Evolutionary quantitative genetics: how little do we know? *Annual review of genetics*, 23(1):337–370. 30
- Barton, N. H. and Keightley, P. D. (2002). Understanding quantitative genetic variation. *Nature Reviews Genetics*, 3(1):11–21.
- Beard, K. C. (2008). The oldest north american primate and mammalian biogeography during the paleocene–eocene thermal maximum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10):3815–3818.
- Behrensmeyer, A. and Turner, A. (2015). Taxonomic occurrences of primates recorded in the paleobiology database. *Fossilworks* – <http://fossilworks.org>. 35
- Bennett, C. V. and Goswami, A. (2012). Morphometric analysis of cranial shape in fossil and recent euprimates. *Anatomy research international*, 2012.
- Berner, D. (2012). How much can the orientation of g’s eigenvectors tell us about genetic constraints? *Ecology and evolution*, 2(8):1834–1842. 40
- Björklund, M. and Gustafsson, L. (2015). The stability of the g-matrix: The role of spatial heterogeneity. *Evolution*, 69(7):1953–1958.
- Blows, M. (2007). A tale of two matrices: multivariate approaches in evolutionary biology. *Journal of evolutionary biology*, 20(1):1–8.
- Blows, M. W., Chenoweth, S. F., and Hine, E. (2004). Orientation of the genetic variance-covariance matrix and the fitness surface for multiple male sexually selected traits. *The American Naturalist*, 163(3):329–340. 45

- Blows, M. W. and Hoffmann, A. A. (2005). A reassessment of genetic limits to evolutionary change. *Ecology*, 86(6):1371–1384.
- Brodie, E. and McGlothlin, J. (2007). A cautionary tale of two matrices: the duality of multivariate abstraction. *Journal of evolutionary biology*, 20(1):9–14.
- 5 Brown, J. L. and Yoder, A. D. (2015). Shifting ranges and conservation challenges for lemurs in the face of climate change. *Ecology and Evolution*, 5(6):1131–1142.
- Bulmer, M. G. et al. (1980). *The mathematical theory of quantitative genetics*. Clarendon Press.
- Burney, D. A., Burney, L. P., Godfrey, L. R., Jungers, W. L., Goodman, S. M., Wright, H. T., and Jull, A. T. (2004). A chronology for late prehistoric madagascar. *Journal of Human Evolution*, 47(1):25–63.
- 10 Calsbeek, R., Smith, T., et al. (2003). Ocean currents mediate evolution in island lizards. *Nature*, 426(6966):552–555.
- Cardini, A. and Elton, S. (2007). Sample size and sampling error in geometric morphometric studies of size and shape. *Zoomorphology*, 126(2):121–134.
- Cartmill, M. (1975). Strepsirhine basicranial structures and the affinities of the cheirogaleidae. In *Phylogeny of the Primates*, pages 313–354. Springer.
- 15 Censky, E., Hodge, K., and Dudley, J. (1998). Over-water dispersal of lizards due to hurricanes. *Nature*, 395(October):553–556.
- Cheverud, J. (1982). Phenotypic, genetic, and environmental morphological integration in the cranium. *Evolution*, 36(3):499–516.
- Cheverud, J. (1984). Quantitative genetics and developmental constraints on evolution by selection. *Journal of*
 20 *Theoretical Biology*, 110(2):155–171.
- Cheverud, J. (1988). A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution*, 42(5):958–968.
- Cheverud, J. (2007a). The dangers of diagonalization. *Journal of evolutionary biology*, 20(1):15–16.
- Cheverud, J. M. (1995). Morphological integration in the saddle-back tamarin (*Saguinus fuscicollis*) cranium. *American Naturalist*, 145(1):63–89.
- 25 Cheverud, J. M. (1996a). Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *American Zoologist*, 36(1):44–50.
- Cheverud, J. M. (1996b). Quantitative genetic analysis of cranial morphology in the cotton-top (*Saguinus oedipus*) and saddle-back (s. fuscicollis) tamarins. *Journal of Evolutionary Biology*, 9(1):5–42.
- Cheverud, J. M. (2007b). The relationship between development and evolution through heritable variation. In
 30 *Novartis Foundation symposium*, volume 284, page 55. Chichester; New York; John Wiley; 1999.
- Cheverud, J. M., Dow, M. M., and Leutenegger, W. (1985). The quantitative assessment of phylogenetic constraints in comparative analyses: sexual dimorphism in body weight among primates. *Evolution*, pages 1335–1351.
- Cheverud, J. M. and Marroig, G. (2007). Comparing covariance matrices: random skewers method compared to the common principal components model. *Genetics and molecular biology*, 30(2):461–469.
- 35 Cheverud, J. M., Wagner, G., and Dow, M. (1989). Methods for the comparative analysis of variation patterns. *Systematic Biology*, 38(3):201–213.
- Cummings, J. R., Muchlinski, M. N., Kirk, E. C., Rehorek, S. J., DeLeon, V. B., and Smith, T. D. (2012). Eye size at birth in prosimian primates: life history correlates and growth patterns. *PloS one*, 7(5):e36097.
- Cuozzo, F. P., Rasoazanabary, E., Godfrey, L. R., Sauther, M. L., Youssouf, I. A., and Lafleur, M. M. (2013). Biolog-
 40 ical variation in a large sample of mouse lemurs from Amboasary, Madagascar: Implications for interpreting variation in primate biology and paleobiology. *Journal of human evolution*, 64(1):1–20.
- Darwin, C. (1859). On the origins of species by means of natural selection. *London: Murray*, page 247.
- de Oliveira, F. B., Porto, A., and Marroig, G. (2009). Covariance structure in the skull of catarrhini: a case of pattern stasis and magnitude evolution. *Journal of human evolution*, 56(4):417–430.
- 45 Dene, H., Goodman, M., and Prychodko, W. (1980). Immunodiffusion systematics of the primates. iv: lemuri-formes. *Mammalia*, 44:211–223.

- Dene, H., Goodman, M., Prychodko, W., and Moore, G. W. (1976). Immunodiffusion systematics of the primates. *Folia primatologica*, 25(1):35–61.
- Dietrich, M. R. and Skipper Jr, R. A. (2012). A shifting terrain: a brief history of the adaptive landscape. *The Adaptive Landscape in Evolutionary Biology*, pages 3–15.
- Dochtermann, N. A. (2011). Testing cheverud’s conjecture for behavioral correlations and behavioral syndromes. *Evolution*, 65(6):1814–1820. 5
- Dunham, A., Maitner, B., Razafindratsima, O., Simmons, M., and Roy, C. (2013). Body size and sexual size dimorphism in primates: influence of climate and net primary productivity. *Journal of evolutionary biology*, 26(11):2312–2320.
- Falconer, D. S. and Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics (4th Edition)*. Prentice Hall. 10
- Farkas, L., Posnick, J., and Hreczko, T. (1992). Growth patterns of the face: a morphometric study. *The Cleft Palate-Craniofacial....*
- Federman, S., Dornburg, A., Daly, D. C., Downie, A., Perry, G. H., Yoder, A. D., Sargis, E. J., Richard, A. F., Donoghue, M. J., and Baden, A. L. (2016). Implications of lemuriform extinctions for the malagasy flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201523825. 15
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies and quantitative characters. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19(1988):445–471.
- Fisher, R. A. (1918). The correlation between relatives on the supposition of mendelian inheritance. *Transactions of the royal society of Edinburgh*, 52(02):399–433. 20
- Fisher, R. A. (1930). *The genetical theory of natural selection: a complete variorum edition*. Oxford University Press.
- Fisher, R. A. (1958). *The genetic theory of natural selection*. Dover.
- Fleagle, J. G. (1999). *Primate adaptation and evolution*. Academic Press, San Diego, CA.
- Fleagle, J. G., Gilbert, C. C., and Baden, A. L. (2010). Primate cranial diversity. *American journal of physical anthropology*, 142(4):565–578. 25
- Fleagle, J. G. and Reed, K. E. (1996). Comparing primate communities: a multivariate approach. *Journal of Human Evolution*, 30(6):489–510.
- Futuyma, D. J. (2010). Evolutionary constraint and ecological consequences. *Evolution*, 64(7):1865–1884.
- Galton, F. (1894). *Natural inheritance*. Macmillan.
- Garcia, G., Hingst-Zaher, E., Cerqueira, R., and Marroig, G. (2014). Quantitative genetics and modularity in cranial and mandibular morphology of calomys expulsus. *Evolutionary Biology*, 41(4):619–636. 30
- Génin, F. G., Masters, J. C., and Ganzhorn, J. U. (2010). Gummivory in cheirogaleids: Primitive retention or adaptation to hypervariable environments? In *The evolution of exudativory in primates*, pages 123–140. Springer.
- Ginn, L. P. and Nekaris, K. (2014). The first survey of the conservation status of primates in southern burkina faso, west africa. *Primate Conservation*, (28):129–138. 35
- Glander, K. E., Wright, P. C., Daniels, P. S., and Merenlender, A. M. (1992). Morphometrics and testicle size of rain forest lemur species from southeastern madagascar. *Journal of Human Evolution*, 22(1):1–17.
- Godfrey, L. (1988). Adaptive diversification of Malagasy strepsirrhines. *Journal of Human Evolution*, 17:93–134.
- Godfrey, L. and Jungers, W. (2003). *Subfossil lemurs*. University of Chicago Press.
- Godfrey, L. R., Jungers, W. L., Simons, E. L., Chatrath, P. S., and Rakotosamimanana, B. (1999). Past and present distributions of lemurs in madagascar. In *New directions in lemur studies*, pages 19–53. Springer. 40
- Goodman, M., Grossman, L. I., and Wildman, D. E. (2005). Moving primate genomics beyond the chimpanzee genome. *Trends in genetics : TIG*, 21(9):511–7.
- Goodman, S. M. and Ganzhorn, J. U. (2004). Biogeography of lemurs in the humid forests of madagascar: the role of elevational distribution and rivers. *Journal of Biogeography*, 31(1):47–55. 45

- Goodman, S. M. and Jungers, W. L. (2014). *Extinct Madagascar: Picturing the Island's Past*. University of Chicago Press.
- Goswami, A. (2006). Cranial modularity shifts during mammalian evolution. *Am Nat*, 168(2):270–280.
- Groeneveld, L. F., Rasoloarison, R. M., and Kappeler, P. M. (2011). Morphometrics confirm taxonomic deflation in dwarf lemurs (primates: Cheirogaleidae), as suggested by genetics. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 161(1):229–244.
- Groves, C. (1974). Taxonomy and phylogeny of prosimians. in *RD Martin, GA Doyle, and AC Walker (Eds.), Prosimian biology, London Duckworth*, pages 449–473.
- Groves, C. (2001). Why taxonomic stability is a bad idea, or why are there so few species of primates (or are there?). *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and ...*, 198(1981):192–198.
- Groves, C. and Trueman, J. (1995). Lemurid systematics revisited. *Journal of human evolution*.
- Groves, C. P. and Eaglen, R. H. (1988). Systematics of the Lemuridae (Primates, Strepsirhini). *Journal of Human Evolution*, 17(5):513–538.
- Groves, C. P. and Helgen, K. M. (2007). Craniodental characters in the taxonomy of propithecus. *International Journal of Primatology*, 28(6):1363–1383.
- Hallgrímsson, B. and Hall, B. K. (2011). *Epigenetics: linking genotype and phenotype in development and evolution*. Univ of California Press.
- Hallgrímsson, B., Jamniczky, H., Young, N., Rolian, C., Parsons, T., Boughner, J., and Marcucio, R. (2009). Deciphering the palimpsest: studying the relationship between morphological integration and phenotypic covariation. *Evolutionary Biology*, 36(4):355–376.
- Hallgrímsson, B., Lieberman, D., Liu, W., Ford-Hutchinson, A., and Jirik, F. (2007). Epigenetic interactions and the structure of phenotypic variation in the cranium. *Evolution & development*, 9(1):76–91.
- Hansen, T. F. and Houle, D. (2008). Measuring and comparing evolvability and constraint in multivariate characters. *Journal of evolutionary biology*, 21(5):1201–19.
- Hansen, T. F. and Martins, E. P. (1996). Translating between microevolutionary process and macroevolutionary patterns: the correlation structure of interspecific data. *Evolution*, pages 1404–1417.
- Hartig, G., Churakov, G., Warren, W. C., Brosius, J., Makalowski, W., and Schmitz, J. (2013). Retrophylogenomics place tarsiers on the evolutionary branch of anthropoids. *Scientific reports*, 3.
- Herrera, J. P. and Davalos, L. M. (2016). Phylogeny and divergence times of lemurs inferred with recent and ancient fossils in the tree. *Systematic Biology*.
- Herring, S. W. and Herring, S. E. (1974). The superficial masseter and gape in mammals. *American Naturalist*, pages 561–576.
- Hill, W. and Thompson, R. (1978). Probabilities of non-positive definite between-group or genetic covariance matrices. *Biometrics*, pages 429–439.
- Horvath, J. E., Perelman, P., Johnson, W. E., Roos, C., Seua, H. N., Moreira, M. A. M., Kessing, B., Pontius, J., Roelke, M., Rumppler, Y., C. M. P., Silva, A., Brien, S. J. O., Pecon-slaterry, J., Seuáñez, H. N., Schneider, M. P. C., and O'Brien, S. J. (2011). A molecular phylogeny of living primates. *PLoS genetics*, 7(3):e1001342.
- Hylander, W. L., Wall, C. E., Vinyard, C. J., Ross, C., Ravosa, M. R., Williams, S. H., and Johnson, K. R. (2005). Temporalis function in anthropoids and strepsirrhines: an emg study. *American Journal of Physical Anthropology*, 128(1):35–56.
- Isler, K., Kirk, E. C., Miller, J. M., Albrecht, G. A., Gelvin, B. R., and Martin, R. D. (2008). Endocranial volumes of primate species: scaling analyses using a comprehensive and reliable data set. *Journal of Human Evolution*, 55(6):967–978.
- Jameson, N. M., Hou, Z.-C., Sterner, K. N., Weckle, A., Goodman, M., Steiper, M. E., and Wildman, D. E. (2011). Genomic data reject the hypothesis of a prosimian primate clade. *Journal of Human Evolution*, 61(3):295–305.
- Jeffery, N., Davies, K., Köckenberger, W., and Williams, S. (2007). Craniofacial growth in fetal tarsius bancanus: brains, eyes and nasal septa. *Journal of anatomy*, 210(6):703–722.

- Johnson, S. E., Gordon, A. D., Stumpf, R. M., Overdorff, D. J., and Wright, P. C. (2005). Morphological Variation in Populations of *Eulemur albocollaris* and *E. fulvus rufus*. *International Journal of Primatology*, 26(6):1399–1416.
- Jones, A. G., Arnold, S. J., and Bürger, R. (2003). Stability of the g-matrix in a population experiencing pleiotropic mutation, stabilizing selection, and genetic drift. *Evolution*, 57(8):1747–1760.
- Jones, A. G., Arnold, S. J., Burger, R., and Fry, J. (2004). Evolution and stability of the g-matrix on a landscape with a moving optimum. *Evolution*, 58(8):1639–1654. 5
- Kamilar, J. M. and Muldoon, K. M. (2010). The climatic niche diversity of malagasy primates: a phylogenetic perspective. *PloS one*, 5(6):e11073.
- Kappeler, P. M. (1991). Patterns of sexual dimorphism in body weight among prosimian primates. *Folia Primatologica*, 57(3):132–146. 10
- Kappeler, P. M. (1996). Intrasexual selection and phylogenetic constraints in the evolution of sexual canine dimorphism in strepsirhine primates. *Journal of Evolutionary Biology*, 9(DECEMBER 1995):43–65.
- Kappeler, P. M. (2000). Lemur origins: Rafting by groups of hibernators? *Folia Primatologica*, 71(6):422–425.
- Kappeler, P. M. and Schaffler, L. (2008). The lemur syndrome unresolved: extreme male reproductive skew in sifakas (*propithecus verreauxi*), a sexually monomorphic primate with female dominance. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(6):1007–1015. 15
- Karanth, K. P., Delefosse, T., Rakotosamimanana, B., Parsons, T. J., and Yoder, A. D. (2005). Ancient DNA from giant extinct lemurs confirms single origin of Malagasy primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14):5090–5.
- Kirk, E. C. (2006). Effects of activity pattern on eye size and orbital aperture size in primates. *Journal of Human Evolution*, 51(2):159–170. 20
- Kirkpatrick, M. and Lofsvold, D. (1992). Measuring selection and constraint in the evolution of growth. *Evolution*, pages 954–971.
- Klingenberg, C. P. (2008). Morphological Integration and Developmental Modularity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1):115–132. 25
- Krause, D. W. (2010). Biogeography: washed up in madagascar. *Nature*, 463(7281):613–614.
- Krzanowski, W. (1979). Between-groups comparison of principal components. *Journal of the American Statistical Association*, 74(367):703–707.
- Lande, R. (1975). The maintenance of genetic variability by mutation in a polygenic character with linked loci. *Genetical research*, 26(03):221–235. 30
- Lande, R. (1976). Natural selection and random genetic drift in phenotypic evolution. *Evolution*, pages 314–334.
- Lande, R. (1979). Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. *Evolution*, pages 402–416.
- Lande, R. (1980a). The genetic covariance between characters maintained by pleiotropic mutations. *Genetics*, 94(1):203. 35
- Lande, R. (1980b). Genetic variation and phenotypic evolution during allopatric speciation. *American Naturalist*, pages 463–479.
- Lande, R. and Arnold, S. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, pages 1210–1226.
- Leamy, L. J., Routman, E. J., and Cheverud, J. M. (1999). Quantitative trait loci for early-and late-developing skull characters in mice: a test of the genetic independence model of morphological integration. *The American Naturalist*, 153(2):201–214. 40
- Lei, R., Frasier, C. L., McLain, A. T., Taylor, J. M., Bailey, C. A., Engberg, S. E., Ginter, A. L., Randriamampionona, R., Groves, C. P., Mittermeier, R. A., et al. (2014). Revision of madagascar's dwarf lemurs (cheirogaleidae: Cheirogaleus): Designation of species, candidate species status and geographic boundaries based on molecular and morphological data. *Primate Conservation*, 28:9–35. 45
- Lessells, C. and Boag, P. (1987). Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *The Auk*, 2(January):116–121.

- Lieberman, D. E. (2011). Epigenetic Integration, Complexity and Evolvability of the Head: Rethinking the Functional Matrix Hypothesis. In Hallgrmsson, B. and Hall, B. K., editors, *Epigenetics: Linking Genotype and Phenotype in Development and Evolution*, pages 271–289. University of California Press, 1st edition.
- Lieberman, D. E., Hallgrmsson, B., Liu, W., Parsons, T. E., and Jamniczky, H. A. (2008). Spatial packing, cranial base angulation, and craniofacial shape variation in the mammalian skull: testing a new model using mice. *Journal of Anatomy*, 212(6):720–735.
- Linde-Medina, M., Boughner, J. C., Santana, S. E., and Diogo, R. (2016). Are more diverse parts of the mammalian skull more labile? *Ecology and Evolution*.
- Lofsvold, D. (1988). Quantitative genetics of morphological differentiation in peromyscus. ii. analysis of selection and drift. *Evolution*, pages 54–67.
- Lomolino, M. V. (1985). Body size of mammals on islands: the island rule reexamined. *The American Naturalist*, 125(2):310–316.
- Lush, J. L. (1937). Animal breeding plans. *Animal breeding plans*.
- Lynch, M. (2007). The frailty of adaptive hypotheses for the origins of organismal complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 Suppl(Table 1):8597–604.
- Lynch, M. and Walsh, B. (1998). *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA (EUA).
- Mackay, T. F., Stone, E. A., and Ayroles, J. F. (2009). The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature Reviews Genetics*, 10(8):565–577.
- Marcucio, R., Hallgrmsson, B., and Young, N. M. (2015). Chapter twelve-facial morphogenesis: Physical and molecular interactions between the brain and the face. *Current topics in developmental biology*, 115:299–320.
- Marcucio, R. S., Young, N. M., Hu, D., and Hallgrmsson, B. (2011). Mechanisms that underlie co-variation of the brain and face. *Genesis*, 49(4):177–189.
- Marroig, G. and Cheverud, J. (2010). Size as a line of least resistance ii: direct selection on size or correlated response due to constraints? *Evolution*, 64(5):1470–1488.
- Marroig, G. and Cheverud, J. M. (2001). A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of new world monkeys. *Evolution*, 55(12):2576–600.
- Marroig, G. and Cheverud, J. M. (2004). Did natural selection or genetic drift produce the cranial diversification of neotropical monkeys? *The American naturalist*, 163(3):417–28.
- Marroig, G. and Cheverud, J. M. (2005). Size as a line of least evolutionary resistance: diet and adaptive morphological radiation in new world monkeys. *Evolution*, 59(5):1128–1142.
- Marroig, G., Melo, D., Porto, A., Sebastiao, H., and Garcia, G. (2011). Selection response decomposition (srd): A new tool for dissecting differences and similarities between matrices. *Evolutionary Biology*, 38(2):225–241.
- Marroig, G., Melo, D. A., and Garcia, G. (2012). Modularity, noise, and natural selection. *Evolution*, 66(5):1506–1524.
- Marroig, G., Shirai, L. T., Porto, A., Oliveira, F. B., and Conto, V. (2009). The evolution of modularity in the mammalian skull ii: Evolutionary consequences. *Evolutionary Biology*, 36(1):136–148.
- Marroig, G., Vivo, M., and Cheverud, J. M. (2004). Cranial evolution in sakis (pithecia, platyrrhini) ii: evolutionary processes and morphological integration. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(1):144–155.
- Martin, R. (1972). Review lecture: Adaptive radiation and behaviour of the Malagasy lemurs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of ...*, 264(862):295–352.
- Martin, R. D. (1992). Goeldi and the dwarfs: the evolutionary biology of the small new world monkeys. *Journal of Human Evolution*, 22(4):367–393.
- Martin, R. D. and Martin, A.-E. (1990). *Primate origins and evolution: a phylogenetic reconstruction*. Chapman and Hall London.
- Masters, J., Rayner, R., and Tattersall, I. (1995). Pattern and process in strepsirhine phylogeny. In *Creatures of the Dark*, pages 31–44. Springer.

- Masters, J. C., Genin, E., Silvestro, D., Lister, A. M., and DelPero, M. (2014). The red island and the seven dwarfs: body size reduction in cheirogaleidae. *Journal of Biogeography*, 41(10):1833–1847.
- Masters, J. C., Lovegrove, B. G., and De Wit, M. J. (2006). Eyes wide shut: can hypometabolism really explain the primate colonization of Madagascar? *Journal of Biogeography*, 34(1):21–37.
- Melo, D., Garcia, G., Hubbe, A., Assis, A., and Marroig, G. (2015). Evolqg - an r package for evolutionary quantitative genetics [version 1; referees: 1 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Research*, 4(925). 5
- Meloro, C., Cáceres, N. C., Carotenuto, F., Sponchiado, J., Melo, G. L., Passaro, E., and Raia, P. (2015). Chewing on the trees: Constraints and adaptation in the evolution of the primate mandible. *Evolution*, 69(7):1690–1700.
- Mendel, G. (1866). Versuche Å¼ber pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brunn* 4:3, 44. 10
- Meyer, K. and Kirkpatrick, M. (2008). Perils of parsimony: properties of reduced-rank estimates of genetic covariance matrices. *Genetics*, 180(2):1153–1166.
- Mittermeier, R., Louis, E., Richardson, M., Schwitzer, C., and Langrand, O. e. a. (2010). *Lemurs of Madagascar 3rd. Ed.* Arlington, Virginia: Conservation International Tropical Field Guide Series.
- Mittermeier, R. A., Ganzhorn, J. U., Konstant, W. R., Glander, K., Tattersall, I., Groves, C. P., Rylands, A. B., Hapke, A., Ratsimbazafy, J., Mayor, M. I., Louis, E. E., Rumpler, Y., Schwitzer, C., and Rasoloarison, R. M. (2008). Lemur Diversity in Madagascar. *International Journal of Primatology*, 29(6):1607–1656. 15
- Mittermeier, R. A. and Rylands, Anthony B., W. D. E. (2013). *Handbook of the Mammals of the World*, volume 3 - Primates. Lynx Edicions.
- Mitteroecker, P. and Bookstein, F. (2007). The conceptual and statistical relationship between modularity and morphological integration. *Systematic biology*, 56(5):818. 20
- Mitteroecker, P. and Bookstein, F. L. (2009). The ontogenetic trajectory of the phenotypic covariance matrix, with examples from craniofacial shape in rats and humans. *Evolution*, 63(3):727–737.
- Montgomery, S. and Mundy, N. (2013). Parallel episodes of phyletic dwarfism in callitrichid and cheirogaleid primates. *Journal of evolutionary biology*, 26(4):810–819. 25
- Moore, M. (1981). The mammalian skull. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Moss, M. L. and Young, R. W. (1960). A functional approach to craniology. *American journal of physical anthropology*, 18(4):281–292.
- Nekaris, A. and Bearder, S. (2007). The Lorisiform primates of Asia and mainland Africa. *Primates in Perspective. Oxford University ...*, pages 23–72. 30
- Oliveira, F., Porto, A., and Marroig, G. (2009). Covariance structure in the skull of catarrhini: a case of pattern stasis and magnitude evolution. *Journal of Human Evolution*, 56(4):417–430.
- Olson, E. and Miller, R. (1958). *Morphological integration*. University of Chicago Press.
- Opperman, L. (2000). Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Developmental dynamics*, 485(September):472–485. 35
- Pastorini, J., Thalmann, U., and Martin, R. D. (2003). A molecular approach to comparative phylogeography of extant Malagasy lemurs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10):5879–84.
- Pavlicev, M., Cheverud, J., and Wagner, G. (2011). Evolution of adaptive phenotypic variation patterns by direct selection for evolvability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1713):1903. 40
- Pavlicev, M., Cheverud, J. M., and Wagner, G. P. (2009a). Measuring morphological integration using eigenvalue variance. *Evolutionary Biology*, 36(1):157–170.
- Pavlicev, M. and Hansen, T. F. (2011). Genotype-Phenotype Maps Maximizing Evolvability: Modularity Revisited. *Evolutionary Biology*, 38(4):371–389.
- Pavlicev, M., Wagner, G., and Cheverud, J. M. (2009b). Measuring evolutionary constraints through the dimensionality of the phenotype: Adjusted bootstrap method to estimate rank of phenotypic covariance matrices. *Evolutionary Biology*, 36(3):339–353. 45

- Pearson, K. (1903). Mathematical contributions to the theory of evolution. xi. on the influence of natural selection on the variability and correlation of organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character*, pages 1–66.
- Pearson, R. G. and Raxworthy, C. J. (2009). The evolution of local endemism in madagascar: watershed versus climatic gradient hypotheses evaluated by null biogeographic models. *Evolution*, 63(4):959–967.
- Pereira, M. E. (1993). Seasonal adjustment of growth rate and adult body weight in ringtailed lemurs. In *Lemur social systems and their ecological basis* (P.G. Kappeler, ed.), pages 205–221. Springer, Plenum Press, New York.
- Perry, J. M., Hartstone-Rose, A., and Wall, C. E. (2011). The jaw adductors of strepsirrhines in relation to body size, diet, and ingested food size. *The Anatomical Record*, 294(4):712–728.
- Pigliucci, M. (2006). Genetic variance–covariance matrices: A critique of the evolutionary quantitative genetics research program. *Biology and Philosophy*, 21(1).
- Pocock, R. (1918). On the external characters of the lemurs and of tarsius. In *Proceedings of the Zoological Society of London*, volume 88, pages 19–53. Wiley Online Library.
- Porto, A., de Oliveira, F., Shirai, L., De Conto, V., and Marroig, G. (2009). The evolution of modularity in the mammalian skull I: morphological integration patterns and magnitudes. *Evolutionary Biology*, 36(1):118–135.
- Porto, A., Shirai, L. T., Oliveira, F. B., and Marroig, G. (2013). Size variation, growth strategies, and the evolution of modularity in the mammalian skull. *Evolution*, 67(11):3305–3322.
- Poux, C., Madsen, O., Marquard, E., Vieites, D. R., de Jong, W. W., and Vences, M. (2005). Asynchronous colonization of Madagascar by the four endemic clades of primates, tenrecs, carnivores, and rodents as inferred from nuclear genes. *Systematic biology*, 54(5):719–30.
- Prôa, M., O’Higgins, P., and Monteiro, L. R. (2013). Type i error rates for testing genetic drift with phenotypic covariance matrices: a simulation study. *Evolution*, 67(1):185–195.
- Provine, W. B. (1971). *The origins of theoretical population genetics: With a new afterword*. University of Chicago Press.
- R Development Core Team (2011). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Radespiel, U., Olivieri, G., Rasolofson, D. W., Rakotondratsimba, G., Rakotonirainy, O., Rasoloharijaona, S., Randrianambinina, B., Ratsimbazafy, J. H., Ratelolahy, F., Randriamboavonjy, T., Rasolofoharivelo, T., Craul, M., Rakotozafy, L., and Randrianarison, R. M. (2008). Exceptional diversity of mouse lemurs (*Microcebus* spp.) in the Makira region with the description of one new species. *American journal of primatology*, 70(11):1033–46.
- Rasmussen, T., Nekaris, K., et al. (1998). Evolutionary history of loriform primates. *Folia Primatologica*, 69(Suppl. 1):250–285.
- Ravosa, M. and Dagosto, M. (2006). *Primate origins: Adaptations and evolution*.
- Ravosa, M. J., Johnson, K. R., and Hylander, W. L. (2000). Strain in the galago facial skull. *Journal of morphology*, 245(1):51–66.
- Reusch, T. and Blanckenhorn, W. U. (1998). Quantitative genetics of the dung fly sepsis cynipsea: Cheverud’s conjecture revisited. *Heredity*, 81(1):111–119.
- Roff, D. (2000). The evolution of the g matrix: selection or drift? *Heredity*, 84(2):135–142.
- Roff, D. (2012). *Evolutionary quantitative genetics*. Springer Science & Business Media.
- Roff, D. and Fairbairn, D. (2011). Path analysis of the genetic integration of traits in the sand cricket: a novel use of blups. *Journal of evolutionary biology*, 24(9):1857–1869.
- Roff, D. A. (1995). The estimation of genetic correlations from phenotypic correlations: a test of cheverud’s conjecture. *Heredity*, 74(5):481–490.
- Roff, D. A. (1997). *Evolutionary quantitative genetics*. New York: Chapman and Hall.
- Roos, C., Schmitz, J., and Zischler, H. (2004). Primate jumping genes elucidate strepsirrhine phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29):10650–4.
- Ross, C. F. and Wall, C. E. (2000). Mammalian feeding and primate evolution: an overview. *American journal of physical anthropology*, 112(4):449–453.

- Sara, V., Hall, K., and Wetterberg, L. (1981). Fetal brain growth: a proposed model for regulation by embryonic somatomedin. *Biology of normal human growth*. Raven, New York, pages 241–252.
- Sarnat, B. and Shanedling, P. (1972). Orbital growth after evisceration or enucleation without and with implants. *Cells Tissues Organs*, 82(4):497–511.
- Schluter, D. (1996). Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution*, pages 1766–1774. 5
- Schwartz, J. H. and Tattersall, I. (1985). Evolutionary relationships of living lemurs and lorises (mammalia, primates) and their potential affinities with european eocene adapidae. *Anthropological papers of the AMNH American Museum of Natural History*, 60; 1.
- Schwartz, J. H. and Tattersall, I. (1987). Tarsiers, adapids and the integrity of strepsirhini. *Journal of Human Evolution*, 16(1):23–40. 10
- Schwitzer, C., Mittermeier, R. A., Johnson, S. E., Donati, G., Irwin, M., Peacock, H., Ratsimbazafy, J., Razafindramanana, J., Louis, E. E., Chikhi, L., et al. (2014). Averting lemur extinctions amid madagascar's political crisis. *Science*, 343:842–843.
- Scott, J. E. (2012). Molar size and diet in the strepsirrhini: Implications for size-adjustment in studies of primate dental adaptation. *Journal of human evolution*, 63(6):796–804. 15
- Seiffert, E. (2007). Early evolution and biogeography of lorisiform strepsirrhines. *American journal of primatology*, 35(July 2005):27–35.
- Seiffert, E., Simons, E., and Attia, Y. (2003). Fossil evidence for an ancient divergence of lorises and galagos. *Nature*, 422(March):421–424.
- Shaw, F. H., Shaw, R. G., Wilkinson, G. S., and Turelli, M. (1995). Changes in genetic variances and covariances: G whiz! *Evolution*, 49(6):1260–1267. 20
- Shirai, L. T. and Marroig, G. (2010). Skull modularity in neotropical marsupials and monkeys: size variation and evolutionary constraint and flexibility. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314(8):663–683.
- Simons, E. L. (1976). *The fossil record of primate phylogeny*. Springer. 25
- Simpson, G. G. (1940). Mammals and Land Bridges. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 30:137–163.
- Simpson, G. G. (1944). *Tempo and mode in evolution*. Number 15. Columbia University Press.
- Sneath, P. H. and Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. WH Freeman.
- Stankiewicz, J., Thiart, C., Masters, J. C., and de Wit, M. J. (2006). Did lemurs have sweepstake tickets? an exploration of simpson's model for the colonization of madagascar by mammals. *Journal of Biogeography*, 33(2):221–235. 30
- Steiper, M. and Seiffert, E. (2012). Evidence for a convergent slowdown in primate molecular rates and its implications for the timing of early primate evolution. *Proceedings of the National ...*
- Steppan, S. (1997). Phylogenetic analysis of phenotypic covariance structure. i. contrasting results from matrix correlation and common principal component analysis. *Evolution*, 51(2). 35
- Steppan, S. J., Phillips, P. C., and Houle, D. (2002). Comparative quantitative genetics: evolution of the g matrix. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(7):320–327.
- Szalay, F. S. and Katz, C. C. (1973). Phylogeny of lemurs, galagos and lorises. *Folia Primatol*, 19:88–103.
- Szalay, F. S., Rosenberger, A. L., and Dagosto, M. (1987). Diagnosis and differentiation of the order primates. *American Journal of Physical Anthropology*, 30(S8):75–105. 40
- Tattersall, I. (2006). Historical biogeography of the strepsirhine primates of Madagascar. *Folia primatologica; international journal of primatology*, 77(6):477–87.
- Tattersall, I. (2007). Madagascar's Lemurs: Cryptic diversity or taxonomic inflation? *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 16(1):12–23. 45
- Tattersall, I. and Schwartz, J. H. (1974). Craniodental morphology and the systematics of the malagasy lemurs (primates, prosimii). *Anthropological papers of the American Museum of Natural History*, 52; 3.

- Tattersall, I. and Schwartz, J. H. (1975). Relationships among the malagasy lemurs. In *Phylogeny of the Primates*, pages 299–312. Springer.
- Tattersall, I. and Schwartz, J. H. (1991). Phylogeny and nomenclature in the "lemur-group" of malagasy strepsirrhine primates. *Anthropological papers of the American Museum of Natural History*, 69.
- 5 Tennenhouse, E. M. (2015). The influence of growth patterns on sexual size monomorphism in lemurs. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(9):1670–1681.
- Turelli, M. (1988). Phenotypic evolution, constant covariances, and the maintenance of additive variance. *Evolution*, 42(6):1342–1347.
- Vences, M., Wollenberg, K. C., Vieites, D. R., and Lees, D. C. (2009). Madagascar as a model region of species
10 diversification. *Trends in ecology & evolution*, 24(8):456–65.
- Via, S. and Hawthorne, D. J. (2005). Back to the future: genetic correlations, adaptation and speciation. In *Genetics of Adaptation*, pages 147–156. Springer.
- Viguier, B. (2002). Is the morphological disparity of lemur skulls (Primates) controlled by phylogeny and/or environmental constraints? *Biological Journal of the Linnean Society*, 76(4):577–590.
- 15 Viguier, B. (2004). Functional adaptations in the craniofacial morphology of Malagasy primates: shape variations associated with gummivory in the family Cheirogaleidae. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 186:495–501.
- Viguier, B. and Tort, A. (2000). Morphologie crânienne et mandibulaire des Indrinae. Apports des méthodes Procrustes et des analyses de Fourier. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*,
20 323(6):573–582.
- Vinyard, C. J. and Hanna, J. (2005). Molar scaling in strepsirrhine primates. *Journal of human evolution*, 49(2):241–269. Cited By (since 1996): 12.
- Vinyard, C. J. and Taylor, A. B. (2010). A preliminary analysis of the relationship between jaw-muscle architecture and jaw-muscle electromyography during chewing across primates. *The Anatomical Record*, 293(4):572–582.
- 25 Vinyard, C. J., Wall, C. E., Williams, S. H., and Hylander, W. L. (2003). Comparative functional analysis of skull morphology of tree-gouging primates. *American journal of physical anthropology*, 120(2):153–70.
- Wagner, G. (1984a). On the eigenvalue distribution of genetic and phenotypic dispersion matrices: evidence for a nonrandom organization of quantitative character variation. *Journal of Mathematical Biology*, pages 77–95.
- Wagner, G., Pavlicev, M., and Cheverud, J. (2007). The road to modularity. *Nature Reviews Genetics*, 8(12):921–931.
- 30 Wagner, G. P. (1984b). Biology 9. pages 77–95.
- Wagner, G. P. (1996). Homologues, natural kinds and the evolution of modularity. *American Zoologist*, 36(1):36–43.
- Walsh, B. (2001). Quantitative Genetics. *Encyclopedia of Life Science*, pages 1–7.
- Walsh, B. and Blows, M. W. (2009). Abundant genetic variation+ strong selection= multivariate genetic constraints: a geometric view of adaptation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40:41–59.
- 35 White, J. (2009). Geometric morphometric investigation of molar shape diversity in modern lemurs and lorises. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 292(5):701–19.
- Williams, B. A., Kay, R. F., Kirk, E. C., and Ross, C. F. (2010). Darwinius masillae is a strepsirrhineda reply to franzen et al.(2009). *Journal of Human Evolution*, 30:1–7.
- Wilmé, L., Goodman, S. M., and Ganzhorn, J. U. (2006). Biogeographic evolution of madagascar's microendemic
40 biota. *science*, 312(5776):1063–1065.
- Wilson, D. and Reeder, D. (2005). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, volume 2. Johns Hopkins University Press.
- Wright, P. C. (1999). Lemur traits and Madagascar ecology: coping with an island environment. *American journal of physical anthropology*, Suppl 29:31–72.
- 45 Wright, P. C. and Jernvall, J. (1999). The future of primate communities: A reflection of the present? in *Primate communities: Cambridge University Press*, page 295.

- Wright, S. (1932). The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding, and selection in evolution. proceedings of the sixth anual congress of genetics, 1, 356 – 366. In *Sewall Wright: Evolution: Selected Papers*, volume 1, pages 161–177. University of Chicago Press, Chicago IL.
- Xing, J., Witherspoon, D. J., Ray, D. A., Batzer, M. A., and Jorde, L. B. (2007). Mobile dna elements in primate and human evolution. *American journal of physical anthropology*, 134(S45):2–19. 5
- Yang, Z. and Yoder, A. D. (2003). Comparison of Likelihood and Bayesian Methods for Estimating Divergence Times Using Multiple Gene Loci and Calibration Points, with Application to a Radiation of Cute-Looking Mouse Lemur Species. *Systematic Biology*, 52(5):705–716.
- Yoder, A. and Nowak, M. (2006). Has vicariance or dispersal been the predominant biogeographic force in Madagascar? Only time will tell. *Annual Review of Ecology, Evolution, and ...*, 37(2006):405–431. 10
- Yoder, A. D. (1996). The use of Phylogeny for reconstructing lemuriform biogeography. *Paris : ORSTOM, p. 245-258. (Colloques et Séminaires)*, pages 245–258.
- Yoder, A. D. (1997). Back to the future: a synthesis of strepsirrhine systematics. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 6(1):11–22.
- Yoder, A. D. (2003). The phylogenetic position of genus tarsius: whose side are you on. *Tarsiers: Past, present, and future*, pages 161–175. 15
- Yoder, A. D. (2012). The lemur revolution starts now: The genomic coming of age for a non-model organism. *Molecular phylogenetics and evolution*.
- Yoder, a. D., Cartmill, M., Ruvolo, M., Smith, K., and Vilgalys, R. (1996a). Ancient single origin for Malagasy primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10):5122–6. 20
- Yoder, A. D. and Irwin, J. a. (1999). Phylogeny of the lemuridae: Effects of character and taxon sampling on resolution of species relationships within eulemur. *Cladistics*, 15(3):351–361.
- Yoder, a. D., Vilgalys, R., and Ruvolo, M. (1996b). Molecular evolutionary dynamics of cytochrome b in strepsirrhine primates: the phylogenetic significance of third-position transversions. *Molecular biology and evolution*, 13(10):1339–50. 25
- Yoder, A. D. and Yang, Z. (2004). Divergence dates for Malagasy lemurs estimated from multiple gene loci: geological and evolutionary context. *Molecular Ecology*, 13(4):757–773.
- Zeng, Z.-B. (1988). Long-term correlated response, interpopulation covariation, and interspecific allometry. *Evolution*, pages 363–374.

5.3 Specimen list

Zoological Museum Collections North-American collections: [AMNH](#)⁸, [FMNH](#)⁹, [USNM](#)¹⁰, [MCZ](#)¹¹ and [DFP](#)¹²; European collections: [RMNH](#)¹³, [AZM](#)¹⁴, [MHNbV](#)¹⁵, [ZMB](#)¹⁶, [MNHN](#)¹⁷

Sex information F: Female; M: Male; IND: Undefined.

- 5 ***Tarsius bancanus*** FMNH-76861-F, RMNH-20538-F, RMNH-15867-IND, RMNH-15860-F, RMNH-28539-F, RMNH-28636-IND, RMNH-28537-F, RMNH-15859-F, RMNH-15858(A)-F, RMNH-28535(A)-F, RMNH-15858(B)-F, RMNH-14559-IND, RMNH-26306-M, RMNH-26305-M, RMNH-26302-M, RMNH-26303-M, RMNH-28529-M, RMNH-26301-M, RMNH-14555-F.

- 10 ***Tarsius syrichta*** FMNH-56757-F, FMNH-56756-M, FMNH-56750-F, FMNH-56749-F, FMNH-56748-F, FMNH-56742-F, FMNH-56741-M, FMNH-56740-F, FMNH-56724-F, FMNH-56159-F, FMNH-56774-F, FMNH-56773-M, FMNH-56772-F, FMNH-56771-M, FMNH-56770-F, FMNH-56769-F, FMNH-56763-M, FMNH-56759-F, FMNH-171110-F, FMNH-171111-IND, FMNH-171112-M, RMNH-15864-F, RMNH-28535(B)-F, RMNH-28538-M, RMNH-47001d-M, RMNH-28533-M, RMNH-28642-F, RMNH-28639-IND.

Allocebus trichotis MNHN-MO-1883-650-IND.

- 15 ***Microcebus berthae*** MNHN-MO-2002-56-IND.

Microcebus myoxinus MNHN-MO-1962-2714-F.

Microcebus rufus MNHN-MO-1912-6-IND, MNHN-MO-1912-15-IND, MNHN-MO-2002-59-F, MNHN-MO-1932-3378-F, MNHN-MO-1994-908-M, MNHN-MO-1880-2537-IND, MNHN-MO-2001-1827-M, MNHN-MO-1899-614-M, MNHN-MO-2002-58-F, MNHN-MO-2002-61-M.

- 20 ***Microcebus tanosi*** MNHN-AC-1932-285-M, MNHN-AC-1932-286-F, MNHN-MO-1962-2706-M,

- 25 ***Microcebus griseorufus*** AMNH-174440-F, AMNH-174496-M, AMNH-174490-M, AMNH-174445-F, AMNH-174434-F, AMNH-174515-F, AMNH-174548-F, AMNH-174522-M, AMNH-174402-F, AMNH-174486-IND, AMNH-174478-M, AMNH-174427-F, AMNH-174463-M, AMNH-174521-M, AMNH-174542-M, AMNH-174390-F, AMNH-174538-M, AMNH-174517-F, AMNH-174494-IND, AMNH-17539-M, AMNH-174483-M, AMNH-174488-M, AMNH-174491-M, AMNH-174462-F, AMNH-154457-F, AMNH-174530-M, AMNH-174477-M, AMNH-174451-F, AMNH-174459-F, AMNH-174470-F, AMNH-174479-M, AMNH-174448-F, AMNH-174482-M, AMNH-174498-M, AMNH-174531-M, AMNH-174454-F, AMNH-174469-F, AMNH-174467-M, AMNH-174484-M, AMNH-185621-F, AMNH-174439-F, AMNH-174436-F, AMNH-174523-M, AMNH-174485-M, AMNH-174453-F, AMNH-174489-M, AMNH-174535-M, AMNH-174456-F, AMNH-174447-F, AMNH-174497-M, AMNH-174460-F, AMNH-174526-M, AMNH-174474-M, AMNH-174458-F, 30 AMNH-174466-M, AMNH-174536-M, AMNH-174400-F, AMNH-174545-M, AMNH-174525-M, AMNH-174455-F, AMNH-174465-M, AMNH-174443-F, AMNH-174442-F, AMNH-185625-F, AMNH-185623-F, AMNH-174404-F, AMNH-174441-F, AMNH-174450-F.

⁸American Museum of Natural History - New York

⁹Field Museum of Natural History - Chicago

¹⁰Smithsonian, National History Museum - Washington D.C.

¹¹Museum of Comparative Zoology - Harvard

¹²Division of Fossil Primates at Duke University - Durham

¹³Rijksmuseum van Natuurlijke Historie - Leiden, Netherlands

¹⁴Amsterdam Zoological Museum - Amsterdam, Netherlands

¹⁵Royal Belgium Institute of Natural Sciences - Brussels, Belgium

¹⁶Museum für Naturkunde - Berlin, Germany

¹⁷Museum National d'Histoire Naturelle - Paris, France

5.3 Specimen list

Microcebus murinus MNHN-MO-1932-3376-F, MNHN-AC-1932-282-A-M, MNHN-AC-1932-282-B-M, MNHN-AC-1932-282-C-M, MNHN-MO-2001-1869-M, MNHN-AC-1936-107-F, MNHN-MO-1991-701-M, MNHN-MO-1991-702-F, MNHN-MO-1962-2715-IND, MNHN-AC-1936-114-F, MNHN-MO-1984-62-M, MNHN-AC-1936-95-M, MNHN-MO-1912-16B-M, MNHN-AC-1936-99-M, MNHN-MO-2001-1829-IND, MNHN-MO-2001-2104-F, MNHN-AC-1936-109-F, MNHN-MO-1911-1408-IND, MNHN-MO-2001-1825-F, MNHN-AC-1936-111-F, MNHN-AC-1936-92-M, MNHN-MO-1908-230-IND, MNHN-AC-1936-115-M, MNHN-AC-1936-90-M, MNHN-AC-1936-100-IND, MNHN-AC-1936-103-M, MNHN-AC-1936-196-M, MNHN-AC-1936-102-IND, MNHN-MO-1986-1213-M, MNHN-MO-2001-1828-M, MNHN-MO-1962-92-F, MNHN-MO-2001-1823-M, MNHN-AC-1936-91-M, MNHN-AC-1936-93-M, MNHN-AC-1936-97-M, MNHN-AC-1936-101-IND, MNHN-AC-1936-104-M, MNHN-AC-1936-105-M, MNHN-AC-1936-106-F, MNHN-AC-1936-89-M, MNHN-AC-1936-110-IND, MNHN-AC-1936-112-F, MNHN-AC-1936-113-F, MNHN-MO-1994-637-IND, MNHN-MO-1912-03-IND, MNHN-MO-1912-16A-F, MNHN-MO-1953-459-M, MNHN-MO-1961-266-M, MNHN-MO-1962-2696-IND, MNHN-MO-1962-2703-IND, MNHN-MO-1962-2704-IND, MNHN-MO-1932-283A-M, MNHN-MO-1932-283B-M, MNHN-MO-1932-283C-M, MNHN-MO-1912-10-IND, MNHN-MO-1912-11-IND, MNHN-MO-1912-7-IND, MNHN-MO-1912-17-IND, MNHN-MO-2006-113-IND, MNHN-MO-1932-287-F, MNHN-AC-1936-86-M, MNHN-MO-1951-11-IND. 5

Mirza coquereli AMNH-100832-M, FPDuke-o137-IND, FPDuke-1139-IND, MCZ-45124-IND. MNHN-MO-1962-83-IND, MNHN-MO-1962-82-F, MNHN-MO-1962-81-F, MNHN-MO-1962-84-IND, MNHN-MO-1962-80-M, MNHN-MO-1869-198-IND, MNHN-MO-1962-2713-IND, MNHN-MO-1962-2711-IND, MNHN-MO-1986-424-M, RMNH-040017f-M, RMNH-040017g-M, RMNH-040017h-M, RMNH-040017i-F, RMNH-040017j-F, RMNH-040017k-F, RMNH-040017l-F, RMNH-040017a-F, ZMB-ZMB-Mam-4355-M. 10

Cheirogaleus crossleyi MCZ-44946-M, MNHN-MO-1940-1202-IND, ZMB-ZMB-Mam-3787-F.

Cheirogaleus major AMNH-16618-IND, FMNH-85144-F, MCZ-44952-F, MCZ-45123-IND, MHNBV-678-IND, MNHN-MO-1903-297-IND, MNHN-MO-2002-46-F, MNHN-MO-2002-44-IND, MNHN-MO-1908-240-IND, MNHN-MO-2002-48-M, MNHN-MO-2001-1832-M, MNHN-MO-2001-2105-M, MNHN-MO-1882-1560-M, MNHN-MO-1884-2442-IND, MNHN-MO-1988-819-IND, MNHN-MO-1871-231-IND, RMNH-04004f-F, RMNH-040004c-F, ZMB-ZMB-Mam-4464-M, ZMB-ZMB-Mam-4823-M, ZMB-ZMB-Mam-5932-M, ZMB-ZMB-Mam-18233(1)-F, ZMB-ZMB-Mam-44646-M, ZMB-ZMB-Mam-45414-M, ZMB-ZMB-Mam-84266-M, ZMB-ZMB-Mam-35352-IND, MCZ-44947-M, MCZ-44948-M, MCZ-44949-M, MNHN-MO-2002-87-IND, MNHN-MO-2002-49-M, USNM-83653-IND. 20

Cheirogaleus medius MNHN-MO-2002-85-IND, MNHN-MO-1912-21A-IND, MNHN-MO-1977-765-F, FPDuke-o34-F, MNHN-MO-1932-3365-IND, MNHN-MO-1932-3364-IND, MNHN-MO-1962-2707-IND, MNHN-MO-1932-3363-F, MNHN-MO-1962-2708-IND, MNHN-MO-2002-86-IND, MNHN-MO-1912-21B-IND, MNHN-MO-1912-22-IND, MNHN-MO-1962-2702-IND, MNHN-MO-1962-87-IND, MNHN-MO-1986-427-M, MNHN-MO-1986-428-M, MNHN-MO-1986-431-F, MNHN-MO-1986-425-M, MNHN-MO-1986-426-M, MNHN-MO-2002-50-IND, MNHN-MO-1935-191-IND, MNHN-MO-1986-429-F, MNHN-MO-1990-431-F, MNHN-MO-1962-88-F, MNHN-MO-1986-430-M, MNHN-MO-1962-89-M, MNHN-MO-1962-2688-IND, MNHN-MO-1962-2690-IND, MNHN-MO-1962-2691-IND, MNHN-MO-1962-2692-IND, MNHN-MO-1962-2694-IND, RMNH-040005e-M, RMNH-040005f-M, RMNH-040005g-M, RMNH-040005h-M, RMNH-040005i-F, RMNH-040005j-F, RMNH-040005k-F, RMNH-040005l-F, RMNH-040005m-F, RMNH-040005a-IND, ZMB-ZMB-Mam-4353-M, ZMB-ZMB-Mam-4354-F. 35

Phanerfurfifer AMNH-100829-IND, MCZ-44953-IND, MCZ-44954-F, MHNBV-679-IND, MNHN-MO-2002-43-M, MNHN-MO-2009-392-IND, MNHN-MO-1924-158-IND, MNHN-MO-1962-95-F, MNHN-MO-1962-96-F, MNHN-MO-1880-2535-IND, MNHN-MO-1880-2536-IND, MNHN-MO-1912-8-IND, MNHN-MO-2005-333-M, ZMB-ZMB-Mam-3838-M, ZMB-ZMB-Mam-84265-M, ZMB-ZMB-Mam-3373-M, ZMB-ZMB-Mam-14462-M, ZMB-ZMB-Mam-89052-M. 45

Phaner pallescens MNHN-MO-2002-41-IND, MNHN-MO-1962-2720-IND, MNHN-MO-1962-2712-IND,

- Lepilemur tymerlachsonorum* MNHN-MO-2002-4-M, MNHN-MO-2002-5-F, MNHN-MO-2002-6-F, MNHN-MO-2002-7-M, MNHN-MO-2002-8-M, MNHN-MO-2002-9-M.
- Lepilemur dorsalis* AMNH-100643-M, RMNH-042006a-F, RMNH-042006b-M, RMNH-042006c-M, RMNH-042006d-M, RMNH-23121-F.
- 5 *Lepilemur ahmansonorum* MNHN-MO-2002-38-M.
- Lepilemur edwardsi* MNHN-MO-2002-13-F, MNHN-MO-2002-24-M, MNHN-MO-2002-25-F, MNHN-MO-2002-26-F, MNHN-MO-2002-33-IND, MNHN-MO-2002-22-F, MNHN-MO-2002-23-F, MNHN-MO-2002-17-M, MNHN-MO-2002-30-IND, MNHN-MO-2002-29-M,
- Lepilemur randrianasoloi* AMNH-100642-F.
- 10 *Lepilemur ruficaudatus* AMNH-100612-M, AMNH-100620-M, AMNH-10622-M, AMNH-100820-M, MNHN-MO-1953-853-IND, MNHN-MO-1958-739-IND, MNHN-MO-1981-435-IND, MNHN-MO-2004-309-IND, MNHN-MO-1880-2509-IND, MNHN-MO-1891-169-IND, MNHN-MO-1962-74-IND, MNHN-MO-1962-2699-IND, MNHN-MO-1962-2727-IND, MNHN-MO-2002-37-M, MNHN-MO-1986-440-M, MNHN-MO-1891-6-IND, MNHN-MO-2002-18-F, MNHN-MO-2002-35-IND, MNHN-MO-2002-40-IND,
- 15 MNHN-MO-1909-288-IND, MNHN-MO-1962-2734-IND, MNHN-MO-2002-36-IND, MNHN-MO-2002-39-IND, MNHN-MO-1962-71-IND, MNHN-MO-1962-77-IND, MNHN-MO-1962-2729-IND, MNHN-MO-1962-2736-IND, MNHN-MO-1962-2894-IND, MNHN-MO-1986-443-IND, MNHN-MO-1986-444-IND, MNHN-MO-1891-696-M, MNHN-MO-1891-697-M, MNHN-MO-1994-2462-F, MNHN-MO-1958-740-F, MNHN-MO-1958-741-F, MNHN-MO-1962-2726-IND, MNHN-MO-1962-2730-IND, MNHN-MO-1962-
- 20 2737-IND.
- Lepilemur leucopus* AMNH-170553-M, AMNH-170560-F, AMNH-170563-F, AMNH-170557-F, AMNH-170558-F, AMNH-170568-F, AMNH-170565-F, AMNH-170567-F, AMNH-170576-M, AMNH-170573-F, AMNH-17578-F, AMNH-170562-F, AMNH-170569-M, AMNH-170566-F, AMNH-170554-F, AMNH-170556-F, AMNH-170555-F, AMNH-170564-M, AMNH-170574-F, AMNH-170575-F, AMNH-170577-M, AMNH-170572-F,
- 25 MCZ-44927-IND, MCZ-44928-M, MCZ-44929-IND, MCZ-44930-IND, MCZ-44932-M, MCZ-44933-F, MCZ-44938-IND, MCZ-44939-IND, MCZ-44940-IND, MCZ-44943-F, MCZ-44944-M, MNHN-MO-1912-26-IND.
- Lepilemur petteri* MNHN-MO-1962-2724-M, MNHN-MO-1962-2700-F, MNHN-MO-1964-233-F.
- Lepilemur betsileo* MCZ-44941-M, RMNH-23112-F.
- Lepilemur jamesorum* AMNH-100834-M, MCZ-44925-IND, MCZ-44926-IND, RMNH-23111-M,
- 30 *Lepilemur mustelinus* MCZ-44931-M, MCZ-BOM-5110-IND, MCZ-BOM-6290-IND, MCZ-16352-M, MCZ-25407-M, MHNHV-7444-M, MNHN-MO-2002-3-F, MNHN-MO-1962-2735-IND, RMNH-042006j-F, RMNH-042006k-M, RMNH-042006l-F, RMNH-042006m-F, RMNH-23126-F, RMNH-23127-M, RMNH-23128-F, RMNH-23129-F, RMNH-23130-M, RMNH-23131-M, RMNH-23132-M, RMNH-23133-F, RMNH-23134-F.
- 35 *Lepilemur microdon* FMNH-5658-M.
- Palaeopropithecus ingens* FPDuke-No-Number-Vitrine-Right-1-IND.
- Palaeopropithecus maximus* AMNH-15883-IND.
- Babakotia radafolia* FPDuke-10994-IND, FPDuke-92-M-224-IND.
- Mesopropithecus dolichobrachion* FPDuke-11755-IND, FPDuke-No-Number-box-IND.

Mesopropithecus pithecoides AMNH-15882-IND.

Avahi meridionalis AMNH-100637-IND, MCZ-44878-M.

Avahi peyrierasi AMNH-170461-M, FMNH-5654-M, MCZ-32503-F, MCZ-44879-IND, MNHN-MO-1932-3358-F, MNHN-MO-1962-2793-F, MNHN-MO-1934-30-IND, MNHN-MO-1882-1493-M, MNHN-MO-1882-1485-F, MNHN-MO-1882-1497-F, MNHN-MO-1882-1498-F, MNHN-MO-1882-1495-M, MNHN-MO-1882-1492-F, MNHN-MO-1882-1486-F, MNHN-MO-1882-1489-F, MNHN-MO-1882-1496-IND, ZMB-ZMB-Mam-35419-F, ZMB-ZMB-Mam-35420-M, ZMB-ZMB-Mam-44675-M, 5

Avahi laniger AMNH-100635-F, MHNHV-677-IND, MHNHV-677B-M, MHNHV-677C-IND, MNHN-MO-1962-2794-F, MNHN-AC-A2885-IND, MNHN-MO-2006-572-IND, MNHN-MO-2002-66-F, MNHN-MO-2002-70-IND, MNHN-MO-2002-71-IND, MNHN-MO-2002-67-M, MNHN-MO-2002-68-F, MNHN-MO-1880-2504-IND, MNHN-MO-1880-2506-IND, MNHN-MO-1880-2507-IND, MNHN-MO-1871-230-F, MNHN-MO-1901-519-IND, RMNH-043001d-IND, RMNH-043001b-M, RMNH-043001e-M, RMNH-043001f-M, RMNH-043001i-M, RMNH-043001k-M, RMNH-043001l-F, RMNH-043001m-F, RMNH-043001n-M, RMNH-043001o-M, RMNH-043001p-M, USNM-83652-IND, USNM-83651-IND, USNM-83650-IND, ZMB-ZMB-Mam-3777-M, ZMB-ZMB-Mam-3809-M, ZMB-ZMB-Mam-3810-F, ZMB-ZMB-Mam-4686-M, ZMB-ZMB-Mam-44672-M, ZMB-ZMB-Mam-44674-F, ZMB-ZMB-Mam-Avahi-IND, 15

Avahi occidentalis MCZ-44877-F.

Propithecus candidus AMNH-100556-M, AMNH-100557-F, MNHN-MO-1883-629-IND, MNHN-MO-1873-7-M, MNHN-MO-1873-8-F, MNHN-MO-1932-3231-M, MNHN-MO-1932-3232-M, RMNH-043007Ca-M, RMNH-043007Cb-F, RMNH-043007Cc-M, RMNH-043007Cd-F, ZMB-ZMB-Mam-44771-IND, ZMB-ZMB-Mam-candidus-M. 20

Propithecus coronatus MCZ-8040-M, MNHN-MO-2012-1019-F, MNHN-MO-1961-54-IND, MNHN-MO-1989-13-M, MNHN-MO-2005-255-M, MNHN-MO-1961-51-F, MNHN-MO-1875-796bis-IND, MNHN-MO-1962-2824-IND, MNHN-MO-1914-73-IND, MNHN-2005-256-IND, ZMB-ZMB-Mam-4009-F, ZMB-ZMB-Mam-44071-IND, ZMB-ZMB-Mam-44072-IND, ZMB-ZMB-Mam-44073-IND, ZMB-ZMB-Mam-84296-M, ZMB-ZMB-Mam-84297-M, ZMB-ZMB-Mam-84298-M. 25

Propithecus deckenii AMNH-17356-IND, AMNH-100540-M, AMNH-100544-M, AMNH-100545-M, AMNH-100548-F, AMNH-100552-F, FMNH-8345-IND, MNHN-MO-1932-486-M, MNHN-MO-1955-665-F, MNHN-MO-1962-2823-IND, MNHN-MO-1932-3245-F, MNHN-MO-1932-3242-M, MNHN-MO-1932-3246-F, MNHN-MO-1932-3240-M, MNHN-MO-1932-3247-F, RMNH-043006a-M, USNM-83964-IND, ZMB-ZMB-Mam-4551-M, ZMB-ZMB-Mam-4553-M, ZMB-ZMB-Mam-5636-F, ZMB-ZMB-Mam-5637-M. 30

Propithecus verreauxi AMNH-100827-IND, AMNH-100542-M, AMNH-100553-M, AMNH-170462-F, AMNH-170463-M, AMNH-170467-M, AMNH-170473-F, AMNH-170489-M, AMNH-170491-F, AMNH-170474-F, AMNH-257141-F, AMNH-170470-IND, FMNH-8341-IND, FMNH-8342-IND, FMNH-89204-IND, MCZ-16719-IND, MCZ-44873-F, MCZ-44875-F, MCZ-44876-IND, MCZ-16452-M, MCZ-16375-M, MCZ-16376-F, MCZ-16377-M, MCZ-16379-M, MCZ-16380-M, MCZ-16381-F, MCZ-16383-M, MCZ-44856-IND, MCZ-44860-IND, MCZ-44861-IND, MCZ-44864-IND, MCZ-16396-M, MCZ-16397-M, MCZ-16398-F, MCZ-16399-M, MCZ-16400-M, MNHN-MO-1961-56-IND, MNHN-MO-1981-773-F, MNHN-MO-1981-772-F, MNHN-MO-1962-2834-F, MNHN-MO-1962-2836-M, MNHN-MO-1981-771-F, MNHN-MO-1981-770-F, MNHN-MO-1909-270-IND, MNHN-MO-1962-2814-F, MNHN-MO-1962-2815-M, MNHN-MO-1962-2819-IND, MNHN-MO-1962-2822-F, MNHN-MO-1991-1453-F, MNHN-MO-1962-2825-IND, MNHN-MO-2004-308-IND, MNHN-MO-1962-2837-F, MNHN-MO-1962-2820-F, MNHN-MO-2002-101-M, RMNH-043011d-M, RMNH-043011e-F, USNM-83965-IND, USNM-38438-IND. 35 40

Propithecus coquereli AMNH-208990-M, AMNH-28991-M, MCZ-8041-IND, MNHN-MO-1962-2900-IND, MNHN-MO-1891-3-IND, RMNH-043005a-M, RMNH-043005b-M, RMNH-043005c-F, RMNH-043005d-F, RMNH-043005h-M, RMNH-043005i-F, RMNH-155ZMA-F, USNM-83966-IND, ZMB-ZMB-Mam-5648-IND.

Propithecus tattersalli AMNH-100554-F, AMNH-100550-F, MNHN-MO-1962-2803-F, MNHN-MO-2009-325-IND, MNHN-MO-1932-3249-F, MNHN-MO-1932-3248-F, USNM-257397-M.

Propithecus diadema AMNH-100633-F, MCZ-BOM-5016-IND, MCZ-18741-F, MCZ-44854-IND, MCZ-16390-M, MHN BV-676-IND, MHN BV-676B-F, MNHN-AC-1954-227-IND, MNHN-MO-1962-2801-IND, MNHN-MO-1994-2316-IND, MNHN-MO-1962-2808-M, MNHN-MO-1962-2830-IND, MNHN-MO-1962-2804-IND, MNHN-MO-1962-2805-M, MNHN-MO-1962-2807-IND, MNHN-MO-1962-2809-F, MNHN-MO-1962-2828-IND, MNHN-MO-1879-290-IND, RMNH-043007b-M, RMNH-157ZMA-IND, RMNH-043007c-IND, RMNH-043007d-F, RMNH-043007e-F, RMNH-043007f-F, RMNH-043007g-M, RMNH-043007h-M, RMNH-043007i-M, RMNH-043007j-F, RMNH-2386(6pd)-IND, USNM-63349-M, USNM-63347-F, USNM-63348-M, ZMB-ZMB-Mam-3776-F, ZMB-ZMB-Mam-4331-M, ZMB-ZMB-Mam-4669-M, ZMB-ZMB-Mam-4670-F, ZMB-ZMB-Mam-5642(2)-F, ZMB-ZMB-Mam-5892-M, ZMB-ZMB-Mam-44070-IND, ZMB-ZMB-Mam-44687-F, ZMB-ZMB-Mam-62697-IND, ZMB-ZMB-Mam-84294-IND, ZMB-ZMB-Mam-A1732-IND.

Propithecus edwardsi AMNH-100957-M, MCZ-8042-IND, MCZ-44853-IND, MNHN-MO-1909-263-IND, MNHN-MO-1962-2810-M, MNHN-MO-1962-2829-M, MNHN-MO-1882-1483-IND, MNHN-MO-1962-2812-IND, MNHN-MO-1889-805-IND, MNHN-MO-1875-831-IND, RMNH-043008b-F, RMNH-043008c-F, RMNH-043008Hc-F, RMNH-043008g-IND, RMNH-043008z-IND, RMNH-043008Ha-M, USNM-63351-F, USNM-63352-F, USNM-21171-IND, ZMB-ZMB-Mam-4552-M, ZMB-ZMB-Mam-4555-F, ZMB-ZMB-Mam-4828-IND, ZMB-ZMB-Mam-4917-M, ZMB-ZMB-Mam-8471-IND, ZMB-ZMB-Mam-84293-IND, ZMB-ZMB-Mam-8467-M, ZMB-ZMB-Mam-A1857-IND, ZMB-ZMB-Mam-P-IND.

Indri indri AMNH-100503-F, AMNH-86638-M, AMNH-100816-F, AMNH-100507-F, AMNH-100508-F, AMNH-100504-IND, MCZ-BOM-5050-IND, MCZ-44851-M, MHN BV-674E-IND, MHN BV-674-IND, MHN BV-674C-IND, MHN BV-674B-IND, MNHN-MO-1932-3253-F, MNHN-MO-1932-3250-M, MNHN-MO-1962-2802-F, MNHN-MO-1932-3251-M, MNHN-MO-1954-228-IND, MNHN-MO-1962-2798-M, MNHN-MO-1901-518-IND, MNHN-MO-1991-1454-IND, MNHN-MO-1981-774-IND, MNHN-MO-1871-225-M, MNHN-MO-2006-553-IND, MNHN-MO-1982-977-IND, MNHN-MO-1871-386-IND, MNHN-MO-1994-2444-IND, MNHN-MO-1869-193-M, MNHN-MO-1962-2799-IND, MNHN-MO-1939-624?-IND, RMNH-043003c-F, RMNH-043004b-M, RMNH-043004e-F, RMNH-043004g-M, RMNH-043004h-F, RMNH-043004i-M, RMNH-043004j-F, RMNH-043004k-F, RMNH-043004l-M, RMNH-043004m-M, RMNH-043004n-F, ZMB-ZMB-Mam-4332-F, ZMB-ZMB-Mam-4333-F, ZMB-ZMB-Mam-4671-M, ZMB-ZMB-Mam-7706-F, ZMB-ZMB-Mam-84271-M, ZMB-ZMB-Mam-84272-F, ZMB-ZMB-Mam-84275-M, ZMB-ZMB-Mam-84276-M, ZMB-ZMB-Mam-84277-M, ZMB-ZMB-Mam-84278-IND, ZMB-ZMB-Mam-84279-F, ZMB-ZMB-Mam-84280-M, ZMB-ZMB-Mam-84281-M, ZMB-ZMB-Mam-84282-M, ZMB-ZMB-Mam-84283-F, ZMB-ZMB-Mam-84284-M, ZMB-ZMB-Mam-84285-F, ZMB-ZMB-Mam-84286-M, ZMB-ZMB-Mam-84287-M,

Archaeolemur edwardsi FPDuke-9902-IND, FPDuke-11826-IND, FPDuke-AMNH-92-M-257-B14-IND, FPDuke-NO-Number-IND, FPDuke-11823-IND, FPDuke-11835-IND, FPDuke-3M-92-M-194-IND, FPDuke-234-IND, FPDuke-9889-IND, FPDuke-7850-IND, FPDuke-9104-IND, FPDuke-9905-IND.

Archaeolemur majori AMNH-3007-IND, AMNH-15885-IND.

Hadropithecus stenognathus FPDuke-No-Number-Vitrine-Right-2-IND.

Eulemur albifrons AMNH-170707-IND, AMNH-100599-F, AMNH-100560-F, AMNH-100566-F, AMNH-100572-F, AMNH-100586-M, AMNH-100587-M, AMNH-100588-M, AMNH-100589(ea)-M, AMNH-100590-M, AMNH-170699-IND, AMNH-170700-F, AMNH-170701-F, AMNH-170705-F, AMNH-170706-F, AMNH-170708-F, AMNH-170712-F, AMNH-170715-F, AMNH-170717-F, AMNH-170720-M, AMNH-170723-F, AMNH-170725-F, AMNH-170728-F, AMNH-170731-M, MHN BV-666-M, MNHN-MO-1879-350-M, MNHN-MO-1962-2782-M, MNHN-MO-1962-2760-M, MNHN-MO-1932-3280-M, MNHN-MO-1932-3281-M, MNHN-MO-1932-3282-F, MNHN-MO-1932-3283-F, MNHN-MO-1932-3284-F, MNHN-MO-1932-3286-F, MNHN-MO-1932-3275-M, MNHN-MO-1932-3277-M, MNHN-MO-1932-3279-M, MNHN-MO-1871-233-F, MNHN-MO-1871-237-F, MNHN-MO-1871-253-M, MNHN-MO-1871-252-M, MNHN-MO-1871-239-M, MNHN-MO-1986-442-F, MNHN-MO-1991-601-M, MNHN-MO-1987-251-M, MNHN-MO-1871-240-M, MNHN-MO-1871-241-M, MNHN-MO-1871-243-M, MNHN-MO-1995-1236-M, RMNH-041001a-IND, RMNH-

5.3 Specimen list

041006b-M, RMNH-41001c-M, RMNH-41001d-M, RMNH-41001e-M, RMNH-41001f-M, RMNH-41001g-F, RMNH-41001h-M, RMNH-41001i-M, RMNH-41001l-M, RMNH-41001m-M, RMNH-41001n-M, RMNH-41001o-M, USNM-63344-M.

Eulemur sanfordi AMNH-100518-F, AMNH-100521-M, AMNH-100577-F, AMNH-100578-F, MNHN-MO-1932-3317-M, MNHN-MO-1932-3316-M, MNHN-MO-1962-3321-IND, MNHN-MO-1932-3318-M, MNHN-MO-1932-3320-F. 5

Eulemur fulvus AMNH-17963-M, AMNH-18696-M, AMNH-22841-F, AMNH-63980-M, AMNH-100528-M, AMNH-31254-M, FMNH-53065-M, FMNH-85136-F, FMNH-171090-IND, MCZ-44882-IND, MCZ-44884(C)-IND, MCZ-BOM-7095-IND, MCZ-59693-IND, MCZ-44884(D)-IND, MHN BV-894-M, MHN BV-4363-M, MNHN-MO-1871-242-M, MNHN-MO-1962-2762-M, MNHN-MO-1963-275-M, MNHN-MO-1990-429-F, MNHN-MO-1974-219-F, MNHN-MO-1996-2159-M, MNHN-MO-1996-2160-M, MNHN-MO-1996-2161-M, MNHN-MO-1962-231-M, MNHN-MO-1981-768-F, MNHN-MO-1962-2743-IND, MNHN-MO-1962-2744-IND, MNHN-MO-1962-2745-IND, MNHN-MO-1962-2757-IND, MNHN-MO-1962-2746-IND, MNHN-MO-1962-2747-IND, MNHN-MO-1962-2755-IND, MNHN-MO-1962-2756-IND, MNHN-MO-1962-2758-IND, RMNH-041006a-F, USNM-63341-F, USNM-63340-M, USNM-63339-M, USNM-63343-F, USNM-83962-IND, USNM-86849-M, USNM-589434-IND, USNM-589433-IND, USNM-542484-F, USNM-589435-IND, USNM-63342-F, ZMB-ZMB-Mam-83852-F, ZMB-ZMB-Mam-44476-F, ZMB-ZMB-Mam-44478-F, ZMB-ZMB-Mam-83848-F, ZMB-ZMB-Mam-83849-M. 10

Eulemur rufifrons MNHN-MO-1962-2786-M, MNHN-MO-1932-3293-F, MNHN-MO-1932-3272-M, MNHN-MO-1932-3273-F, MNHN-MO-1932-3274-F, MNHN-MO-1932-3292-F, MNHN-MO-1932-3331-IND, RMNH-041010o-F, RMNH-041010q-F, RMNH-041010a-M, RMNH-041010b-M, RMNH-041010c-M, RMNH-041010d-M, RMNH-041010e-M, RMNH-041010f-M, RMNH-041010g-M, RMNH-041010h-M, RMNH-041010j-M, RMNH-041010k-F, RMNH-041010l-F, ZMB-ZMB-Mam-35326-IND, ZMB-ZMB-Mam-5889-IND, ZMB-ZMB-Mam-5890-M, ZMB-ZMB-Mam-5891-M, ZMB-ZMB-Mam-44074-IND. 20

Eulemur rufus AMNH-41262-M, AMNH-100524-M, AMNH-100532-F, AMNH-100569-M, AMNH-100607-M, AMNH-100614-F, AMNH-100819-F, AMNH-17403-M, AMNH-100517-M, AMNH-100522-M, AMNH-100523-M, AMNH-41264-F, AMNH-41648-M, FMNH-8337-IND, MCZ-44897-F, MCZ-16353-M, MCZ-16354-M, MCZ-16355-M, MCZ-16356-F, MCZ-16357-F, MCZ-16358-F, MCZ-16359-F, MCZ-16366-F, MCZ-16369-F, MCZ-16370-F, MCZ-16393-F, MCZ-16394-M, MCZ-16395-M, MHN BV-4003-M, MHN BV-4004-F, MHN BV-4007-F, MHN BV-667B-F, MHN BV-4005-M, RMNH-2386(7)F-IND, USNM-63338-M, USNM-83958-IND, USNM-83961-IND, USNM-83957-IND, USNM-83959-IND, ZMB-ZMB-Mam-83953-F, ZMB-ZMB-Mam-32555-IND, ZMB-ZMB-Mam-12288-IND, ZMB-ZMB-Mam-4916-M. 25

Eulemur cinereiceps AMNH-100570-F, AMNH-100561-F, AMNH-100562-F, MHN BV-3994-M, MNHN-MO-1962-2781-M, MNHN-MO-1882-1521-M, MNHN-MO-1962-2775-F, MNHN-MO-1962-2776-M, MNHN-MO-1962-2780-F, MNHN-MO-1962-2783-F, MNHN-MO-1962-2787-F, MNHN-MO-1962-3288-M, MNHN-MO-1932-3290-F, MNHN-MO-1932-3294-F, MNHN-MO-1932-3302-F, RMNH-ZMA68-IND, ZMB-ZMB-Mam-4820-M, ZMB-ZMB-Mam-5646-F, ZMB-ZMB-Mam-5884-M, ZMB-ZMB-Mam-5885-M, ZMB-ZMB-Mam-5886-M, ZMB-ZMB-Mam-5887-F. 35

Eulemur collaris AMNH-170749-F, AMNH-170750-F, AMNH-170755-F, AMNH-170759-M, AMNH-170760-M, AMNH-17064-F, AMNH-170765-M, AMNH-170766-M, AMNH-170770-F, AMNH-170773-M, AMNH-170772-M, AMNH-177071-F, AMNH-100818-F, MCZ-44886-IND, MCZ-44887-IND, MCZ-44888-IND, MCZ-44889-IND, MCZ-44890-IND, MCZ-44892-M, MCZ-44895-M, MCZ-44896-F, MHN BV-3992-M, MHN BV-4011-M, MHN BV-4012-M, MNHN-MO-1882-1523-M, MNHN-MO-1953-867-IND, MNHN-MO-1989-119-IND, MNHN-A-3916-IND, RMNH-41004b-M, RMNH-41004c-M, RMNH-41004d-M, RMNH-41004e-M, RMNH-41004f-M, RMNH-41004i-F, RMNH-41004j-F, RMNH-41004k-F, RMNH-41004l-F, RMNH-41004m-F, RMNH-41004n-M, RMNH-41004o-F, RMNH-41004p-F, RMNH-41004q-F, RMNH-41004cc-IND, RMNH-41004dd-M, RMNH-41004ee-M, RMNH-41004ff-F, RMNH-41004gg-M, RMNH-41004hh-F, RMNH-41004ii-M, RMNH-41004jj-M, RMNH-41004ll-M, RMNH-41004oo-IND, ZMB-ZMB-Mam-44668-M, ZMB-ZMB-Mam-44669-M, ZMB-ZMB-Mam-44671-M, ZMB-ZMB-Mam-44670-F. 40

Eulemur mongoz AMNH-100539-F, AMNH-100608-F, MCZ-45121-IND, MHNHV-8984-F, MHNHV-9315-M, MHNHV-16326-F, MNHN-MO-1993-1669-F, MNHN-MO-1871-471-IND, MNHN-MO-1871-1171-IND, MNHN-AC-1888-726-IND, MNHN-AC-1901-521-IND, MNHN-AC-1888-95-IND, MNHN-AC-1952-238-IND, MNHN-MO-1987-253-M, MNHN-MO-1871-235-F, MNHN-AC-1887-496-IND, MNHN-MO-
 5 1974-159-M, MNHN-AC-1905-65-M, MNHN-AC-1954-74-F, MNHN-AC-1896-428-F, MNHN-AC-1887-918-IND, MNHN-AC-1887-19-IND, RMNH-041008b-M, RMNH-041008a-IND, RMNH-ZMA69-IND, RMNH-ZMA70-IND, RMNH-041008c-M, RMNH-041008f-F, RMNH-041008g-F, RMNH-041008h-M, RMNH-041008i-F, RMNH-041010p-IND, USNM-337946-F, USNM-A35260-IND, USNM-A49947-IND, ZMB-ZMB-Mam-2923-IND, ZMB-ZMB-Mam-9036-F, ZMB-ZMB-Mam-44477-F, ZMB-ZMB-Mam-83853-F, ZMB-ZMB-
 10 Mam-83854-M, ZMB-ZMB-Mam-83855-F, ZMB-ZMB-Mam-83960-IND, ZMB-ZMB-Mam-83961-M, ZMB-ZMB-Mam-83962-F, ZMB-ZMB-Mam-83963-IND, ZMB-ZMB-Mam-83964-M, ZMB-ZMB-Mam-83965-M, ZMB-ZMB-Mam-83966-IND, ZMB-ZMB-Mam-A2953-IND, ZMB-ZMB-Mam-MZ-M, ZMB-ZMB-Mam-A24-IND.

Eulemur rubriventer AMNH-100567-M, AMNH-100603-F, AMNH-100604-M, FMNH-5651-F, MCZ-44881-F, MCZ-44883-IND, MCZ-44885-IND, MCZ-44898-F, MCZ-44899-M, MHNHV-665B-M, MHNHV-665-F, MNHN-MO-1932-3332-M, MNHN-MO-1932-3333-M, MNHN-MO-1932-3334-M, MNHN-MO-1932-3336-F, MNHN-MO-1932-3337-F, MNHN-MO-1962-2771-M, MNHN-MO-1962-2789-M, MNHN-MO-1882-1540-F, MNHN-MO-1882-1543-F, MNHN-MO-1871-244-F, MNHN-MO-2012-1020-IND, RMNH-041009a-M, RMNH-041009b-M, RMNH-041009c-F, RMNH-041009d-M, RMNH-041009e-M, RMNH-041009f-
 20 F, RMNH-041009g-F, RMNH-041009h-F, RMNH-041009i-M, RMNH-041009j-M, RMNH-041009k-M, RMNH-041009l-M, RMNH-041009m-M, RMNH-041009n-M, RMNH-041009o-F, RMNH-041009p-F, RMNH-041009q-F, RMNH-041009r-M, RMNH-041009s-M, RMNH-041009t-IND, RMNH-2386(6er)-IND, USNM-63335-F, USNM-63337-M, USNM-83960-IND, ZMB-ZMB-Mam-4690-IND, ZMB-ZMB-Mam-5882-M, ZMB-ZMB-Mam-5883-F, ZMB-ZMB-Mam-83837-F, ZMB-ZMB-Mam-89023-F, ZMB-ZMB-Mam-16692-F.

Eulemur coronatus AMNH-18039-F, AMNH-19007-F, AMNH-19136-F, AMNH-100520-F, AMNH-100538-M, AMNH-100610-M, AMNH-100611-M, AMNH-100615-M, AMNH-100617-M, MNHN-MO-1932-3305-M, MNHN-MO-1932-3306-M, MNHN-MO-1932-3307-M, MNHN-MO-1932-3308-M, MNHN-MO-1932-3309-M, MNHN-MO-1932-3310-M, MNHN-MO-1932-3311-M, MNHN-MO-1962-2785-F, MNHN-MO-1874-99-M, MNHN-MO-1962-2759-IND, MNHN-MO-1906-96-IND, RMNH-041005a-F, RMNH-41005c-
 30 M, ZMB-ZMB-Mam-3778-M, ZMB-ZMB-Mam-5644-M, ZMB-ZMB-Mam-5645-F.

Eulemur flavifrons MNHN-MO-1962-2788-F, MNHN-MO-1885-389-M, MNHN-MO-1877-282-IND, MNHN-MO-1887-448-IND.

Eulemur macaco AMNH-100530-F, AMNH-100531-F, AMNH-100606-M, AMNH-69535-F, FMNH-81543-IND, FMNH-121289-F, FMNH-121542-IND, FMNH-121545-F, FMNH-150722-M, MHNHV-894B-M, MNHN-MO-1962-2750-M, MNHN-MO-1962-2763-F, MNHN-MO-1962-2765-IND, MNHN-MO-1962-2772-M, MNHN-MO-1997-1399-F, MNHN-MO-2005-816-IND, MNHN-MO-2005-1015-F, MNHN-AC-1883-067-M, MNHN-MO-1871-111-F, MNHN-MO-1908-213-M, MNHN-MO-1921-216-F, MNHN-MO-1931-843-F, MNHN-MO-1933-2338-M, MNHN-MO-1883-159-M, MNHN-MO-1961-157-F, MNHN-MO-1973-158-M, RMNH-1147-F, RMNH-041007a-M, RMNH-041007b-M, RMNH-041007c-M, RMNH-041007d-
 40 M, RMNH-041007e-M, RMNH-041007g-M, RMNH-041007h-M, RMNH-041007k-F, RMNH-041007m-F, RMNH-041007n-F, RMNH-041007p-F, RMNH-041007q-F, RMNH-041007r-F, RMNH-041007s-F, RMNH-041007t-F, RMNH-041007u-M, RMNH-1813-F, USNM-255517-M, USNM-125465-F, ZMB-ZMB-Mam-5651-M, ZMB-ZMB-Mam-83841-M, ZMB-ZMB-Mam-11961-IND, ZMB-ZMB-Mam-9049-IND, ZMB-ZMB-Mam-83967-IND, ZMB-ZMB-Mam-16185-F, ZMB-ZMB-Mam-1867-M, ZMB-ZMB-Mam-2922-IND, ZMB-
 45 ZMB-Mam-3415-F.

Haplemur alaotrensis MCZ-16373-F, MCZ-16374-F.

Haplemur occidentalis MNHN-MO-1882-1555-M, MNHN-MO-1882-1554-F.

5.3 Specimen list

Hapalemur griseus AMNH-61589-M, AMNH-100628-F, AMNH-100823-F, AMNH-170669-F, AMNH-170672-F, AMNH-170682-F, AMNH-170668-F, AMNH-170689-F, AMNH-100535-F, AMNH-100536-F, AMNH-100534-F, FMNH-57631-F, MCZ-37808-IND, MCZ-44910-M, MCZ-44911-F, MCZ-44912-F, MCZ-44913-M, MCZ-44914-IND, MCZ-44916-M, MCZ-44917-IND, MCZ-44918-IND, MCZ-44920-M, MCZ-44921-M, MCZ-44922-IND, MCZ-44923-F, MNHN-MO-1932-3356-M, MNHN-MO-1932-3352-M, MNHN-MO-2000-377-IND, MNHN-MO-2002-94-IND, MNHN-MO-1939-6464-IND, MNHN-MO-1916-74-IND, MNHN-MO-2006-517-IND, MNHN-MO-2002-83-IND, RMNH-041014a-M, RMNH-041014b-M, RMNH-041014c-M, RMNH-041014d-M, RMNH-041014e-F, RMNH-041014f-F, RMNH-041014g-M, RMNH-041014i-M, RMNH-041014j-M, RMNH-041014k-M, RMNH-041014m-F, RMNH-041014n-F, RMNH-041014o-F, RMNH-041014q-F, RMNH-041014r-F, RMNH-041014s-F, RMNH-041014t-IND, RMNH-222b-IND, RMNH-2386(10)-IND, USNM-317966-F, USNM-63355-M, USNM-84386-IND, USNM-83668-IND, USNM-63356-F.

Hapalemur aureus MNHN-MO-1940-318-M, MNHN-MO-1936-83-F.

Prolemur simus FPDuke-10981-A-IND, FPDuke-10981-B-IND, FPDuke-10981-C-IND, FPDuke-10977-IND, FPDuke-10941-IND, FPDuke-10956-C-IND, FPDuke-11714-IND, FPDuke-10980-IND, FPDuke-10956-A-IND, FPDuke-7938-IND, FPDuke-109890-A-IND, FPDuke-10942-IND, FPDuke-10978-A-IND, FPDuke-10978-B-IND, FPDuke-10978-C-IND, FPDuke-10983-IND, FPDuke-7878-IND, FPDuke-7856-IND, FPDuke-12826-IND, FPDuke-11783-IND, FPDuke-9076-IND, FPDuke-9062-IND, FPDuke-7971-IND, MCZ-BOM-6341-IND, MNHN-MO-1882-1552-F, MNHN-MO-1882-1553-M, RMNH-041017a-F, ZMB-ZMB-Mam-16510-IND.

Lemur catta AMNH-170597-F, AMNH-100596-M, AMNH-100821-M, AMNH-100824-F, AMNH-100825-F, AMNH-170737-F, AMNH-170739-M, AMNH-170740-M, AMNH-170741-M, AMNH-170743-M, AMNH-35577-IND, AMNH-170744-M, AMNH-150039-IND, AMNH-22912-IND, AMNH-100589(lc)-M, FMNH-98767-IND, FMNH-89766-M, FMNH-157993-F, MHNBV-39131-IND, MHNBV-4360-M, MHNBV-3990-M, MHNBV-3989-F, MHNBV-3997-M, MHNBV-670F-IND, MHNBV-671-M, MNHN-MO-2012-64-M, MNHN-MO-2002-74-IND, MNHN-MO-1914-307-M, MNHN-MO-1992-1857-M, MNHN-MO-1987-123-M, MNHN-MO-1987-626-IND, MNHN-MO-1962-2754-M, MNHN-MO-1962-2753-IND, MNHN-MO-1987-267-M, MNHN-A-3917-IND, MNHN-MO-1896-379-F, MNHN-AC-1909-289-M, MNHN-MO-1908-371-F, MNHN-MO-1907-51-F, RMNH-041016c-F, RMNH-041016e-M, RMNH-041016f-F, RMNH-041016g-M, RMNH-041016k-IND, RMNH-2293-M, RMNH-1745-M, RMNH-2443-F, RMNH-11149-M, RMNH-10576-F, RMNH-11150-M, RMNH-9281-M, RMNH-11263-IND, RMNH-041016a-IND, USNM-589559-M, USNM-83963-IND, USNM-589576-M.

Pachylemur jullyi AMNH-15884-IND, MNHN-MO-1910-101(1)-IND, MNHN-MO-1910-101(2)-IND.

Varecia rubra AMNH-100510-F, AMNH-100513-M, AMNH-100514-M, MNHN-MO-1971-49-M, MNHN-MO-1932-3264-M, MNHN-MO-1932-3265-M, MNHN-MO-1932-3266-M, MNHN-MO-1932-3268-F, MNHN-MO-1871-248-F, MNHN-MO-1871-249-F, RMNH-041018a-M, RMNH-041018b-M, RMNH-041018c-F, RMNH-041018e-F, RMNH-041018f-F, RMNH-041018i-F, RMNH-2386(9)-IND, RMNH-2386(8)-M.

Varecia variegata AMNH-77792-IND, AMNH-83955-IND, AMNH-35561-M, AMNH-17338-F, AMNH-22897-F, AMNH-35090-M, AMNH-35109-M, AMNH-100511-F, AMNH-100512-F, AMNH-70220-F, AMNH-170784-F, FMNH-129349-M, FMNH-134468-IND, FMNH-8347-IND, FMNH-81541-IND, FMNH-104939-M, MHNBV-664-IND, MHNBV-663F-F, MHNBV-4009-F, MHNBV-4008-M, MHNBV-663-IND, MHNBV-663B-M, MHNBV-4361-F, MHNBV-4362-M, MNHN-MO-1991-602-F, MNHN-MO-1990-430-M, MNHN-MO-1882-1513-IND, MNHN-MO-1882-1508-IND, MNHN-MO-1882-1504-M, MNHN-MO-1882-1510-F, MNHN-MO-1882-1503-IND, MNHN-MO-2004-403-IND, MNHN-MO-1985-1813-IND, MNHN-MO-1962-2748-IND, MNHN-MO-1962-2766-F, MNHN-MO-1879-348-IND, MNHN-MO-1883-642-IND, RMNH-041019o-M, RMNH-041019p-M, RMNH-041019q-M, RMNH-41btw15-16-F, RMNH-041019c-M, RMNH-041019d-F, RMNH-041019e-M, RMNH-041019f-F, RMNH-041019g-F, RMNH-041019h-F, RMNH-041019i-M, RMNH-041019j-IND, RMNH-041019l-M, RMNH-041019m-M, RMNH-041019n-F, USNM-63346-F, USNM-A21172-IND, USNM-84382-IND, USNM-84381-IND, USNM-84383-IND, USNM-503392-IND, USNM-16199-IND, USNM-124646-F, USNM-63345-F, USNM-538407-M.

Megaladapis edwardsi AMNH-30024001-IND.

Megaladapis madagascariensis AMNH-12850-IND.

Megaladapis grandidieri FPDuke-24801-IND, FPDuke-11787-IND, FPDuke-No-Number-Vitrine-Left-IND,

Daubentonia madagascariensis AMNH-41334-IND, AMNH-100632-F, FMNH-15529-IND, MCZ-45946-IND, MHNBV-662B-IND, MHNBV-662E-M, MNHN-MO-1992-4-M, MNHN-MO-1962-2687-IND, MNHN-MO-1962-2094-IND, MNHN-MO-1962-2095-IND, MNHN-MO-1915-29-M, MNHN-MO-1930-473-M, MNHN-MO-1907-841-F, MNHN-MO-2002-78-M, MNHN-MO-1883-648-IND, MNHN-MO-2002-80-IND, MNHN-MO-2012-1021-M, MNHN-MO-2009-324-M, MNHN-MO-2004-400-M, MNHN-MO-1901-647-M, MNHN-MO-1984-645-IND, RMNH-7048a-F, RMNH-2386(16a)-F, RMNH-11235-M, RMNH-044001c-M, RMNH-ZMA531-IND, RMNH-ZMA153-IND, RMNH-ZMA154-IND, RMNH-044001a-IND, USNM-305066-M, USNM-199694-IND, ZMB-ZMB-Mam-2921-F.

Arctocebus calabarensis AMNH-207949-M, FMNH-99360-M, MNHN-MO-1982-533-M, RMNH-16899-F, RMNH-9917ZMA-M, RMNH-17202ZMA-F, RMNH-10728ZMA-F, RMNH-10754ZMA-M, RMNH-10727ZMA-M.

Perodicticus potto FMNH-54436-F, FMNH-54437-M, FMNH-62218-M, FMNH-98747-IND, FMNH-171105-IND, FMNH-171106-IND, FMNH-171107-IND, FMNH-171108-IND, FMNH-148987-M, FMNH-94239-F, FMNH-57519-M, FMNH-57632-IND, MNHN-MO-2000-1101-IND, MNHN-MO-2000-1102-IND, MNHN-MO-2000-1096-IND, MNHN-MO-2000-1097-IND, MNHN-MO-1962-1191-F, MNHN-MO-1962-1192-M, USNM-429533-M, USNM-429534-F, USNM-429535-M, USNM-429536-F, USNM-282371-IND, USNM-465894-F, USNM-465896-M, USNM-465899-M, USNM-465900-F, USNM-465901-F, USNM-465902-M, USNM-450050-F, USNM-450051-M, USNM-450052-M, USNM-450053-F, USNM-450054-F, USNM-450055-M, USNM-450056-F, USNM-450057-M, USNM-537770-M, USNM-545837-F, USNM-598478-M, USNM-598479-F, USNM-598480-M, USNM-598481-M, USNM-598482-M, USNM-598483-M, USNM-439096-F, USNM-439099-M, USNM-439100-M, USNM-465907-M, USNM-465910-F, USNM-465911-F, USNM-377270-M, USNM-253619-M, USNM-270156-M, USNM-270530-M.

Perodicticus edwardsi FMNH-74215-M, FMNH-48929-F.

Perodicticus ibeanus FMNH-171109-F, FMNH-44393-M, USNM-184227-M, USNM-184230-F.

Loris lydekkerianus AMNH-165930-M, AMNH-165931-M, AMNH-217303-M.

Loris tardigradus AMNH-269-IND, AMNH-34256-M, AMNH-34257-M, AMNH-15059-M, FMNH-171096-IND, FMNH-92861-F, MNHN-MO-1959-158-F, MNHN-MO-1958-717-F, MNHN-MO-1958-718-M, RMNH-19181ZMA-M, RMNH-5544ZMA-F, RMNH-5484ZMA-M, RMNH-10341ZMA-F, RMNH-21895ZMA-M, RMNH-045004e-IND.

Loris grandis FMNH-99479-M, FMNH-95024-M, FMNH-95025-IND, FMNH-95026-M, FMNH-95027-M,

Loris nordicus FMNH-95028-M, FMNH-95029-IND, FMNH-95030-M.

Nycticebus bengalensis FMNH-37988-M, FMNH-99616-F, FMNH-57330-F.

Nycticebus coucang FMNH-108856-F, FMNH-186910-M, FMNH-98478-M, FMNH-98479-M, FMNH-171097-F, FMNH-171098-F, FMNH-171099-M, FMNH-171100-M, FMNH-171101-F, FMNH-171102-F, FMNH-171104-F, FMNH-57137-F, FMNH-60790-F, USNM-290462-M, USNM-291732-IND, USNM-115496-F, USNM-355347-F, USNM-291274-F, USNM-488075-M, USNM-300000-IND, USNM-291275-IND, USNM-488079-F, USNM-488080-M, USNM-488078-M, USNM-105022-F, USNM-355065-M, USNM-84389-F, USNM-114151-M, USNM-488076-F, USNM-283915-F, USNM-294414-M.

5.3 Specimen list

Nycticebus menagensis FMNH-1168-F, FMNH-89463-IND, FMNH-89464-M, FMNH-89465-M, FMNH-89467-M, FMNH-57318-IND.

Nycticebus javanicus FMNH-140937-F,

Euoticus elegantulus AMNH-114203-M, AMNH-119803-IND, AMNH-236351-M, AMNH-236352-F, AMNH-236353-F, AMNH-241126-F, AMNH-241127-M, AMNH-269911-M, AMNH-269914-F, MNHN-MO-1959-159-IND, MNHN-MO-2002-42-IND, RMNH-7787ZMA-M, RMNH-7786ZMA-M, RMNH-046001a-M, RMNH-046001b-F. 5

Otolemur crassicaudatus USNM-365707-F, USNM-365708-F, USNM-365711-M, USNM-365712-F, USNM-365713-M, USNM-365714-M, USNM-365715-F, USNM-365716-M, USNM-365735-F, USNM-352259-F, USNM-352260-M, USNM-314045-IND, USNM-399064-F, USNM-399057-IND, USNM-399059-M, USNM-399060-F, USNM-399063-M, USNM-399068-M, USNM-397989-M, USNM-397990-M, USNM-397991-F, USNM-398001-M, USNM-398008-M, USNM-398009-M, USNM-397993-M, USNM-397994-F.

Otolemur kirkii USNM-352257-F, USNM-352261-M, USNM-352262-M, USNM-352263-F, USNM-352264-F, USNM-365709-M, USNM-365710-M, USNM-365717-F, USNM-365718-M, USNM-365719-F, USNM-365720-M, USNM-365721-M, USNM-365722-F, USNM-365723-M, USNM-365724-M, USNM-365725-F, USNM-365726-M, USNM-365727-M, USNM-365728-M, USNM-365729-F, USNM-365730-M, USNM-365731-F, USNM-365732-M, USNM-365733-M, USNM-368616-F, USNM-425413-M, USNM-425414-F, USNM-425415-M, USNM-425416-M, USNM-425417-M, USNM-425418-M, USNM-470260-F, USNM-470261-M, 15

Galago senegalensis USNM-452953-M, USNM-452954-F, USNM-452955-M, USNM-452956-M, USNM-452957-M, USNM-452958-F, USNM-452959-F, USNM-452960-F, USNM-452961-F, USNM-452962-F, USNM-454758-M, USNM-454759-F, USNM-454760-F, USNM-454761-F, USNM-454762-M, USNM-454763-M, USNM-454764-F, USNM-454765-F, USNM-454766-M, USNM-454767-F, USNM-454768-M, USNM-454769-M, USNM-454770-F, USNM-454772-M, USNM-454773-F, USNM-454775-M, USNM-454776-F, USNM-454778-F, USNM-454712-F, USNM-454713-M, USNM-454714-F, USNM-454715-M, USNM-454716-M, USNM-454717-M, USNM-454718-M, USNM-454719-F, USNM-454720-M, USNM-454722-F, USNM-454723-F, USNM-454724-F, USNM-454725-M, USNM-454727-M, USNM-454728-F, USNM-454729-F, USNM-454730-F, USNM-454731-M, USNM-454732-M, USNM-454733-F, USNM-454734-M, USNM-454735-M, USNM-454736-F, USNM-454737-M, USNM-454739-F, USNM-454740-M, USNM-454741-M, USNM-454745-M, USNM-454746-M, USNM-454747-F. 20 25 30

ECDISE #9

Eu cresço como um inseto.

Troco uma casca, aumento em tamanho e mudo de forma.

É pra melhor comportar todo esse volume de gente dentro de mim, até sair voando.