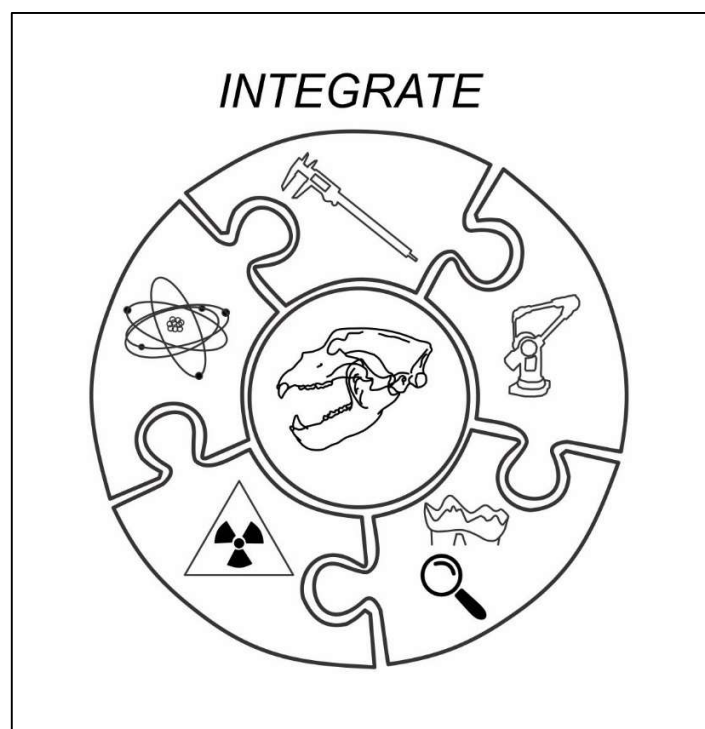


## RAPORT ȘTIINȚIFIC

### *Paleoecologia și extincția mamiferelor mari din Stadiile Izotopice 3-1 din Carpații Românești: o abordare integrativă*



*1 Ianuarie – 31 Decembrie 2023*

#### ***ECHIPA PROIECTULUI***

Dr. Marius Robu  
Dr. Ionuț-Mirea Cornel  
Dr. Luchiana Faur  
Dr. Alexandru Petculescu  
Dr. Marius Vlaicu

#### ***COLABORATORI***

Dr. Florent Rivals  
Dr. Carlo Meloro  
Dr. Sébastien Olive  
Dr. Laura Tîrlă  
Dr. Vlad Codrea  
Dr. Laurențiu Angheluță

Dr. Nimrod Marom  
Dr. Meirav Meiri  
Dr. Jeremy E. Martin  
Dr. Ștefan Vasile  
Dr. Mateusz Baca

## CUPRINS

<b>1. Vizite de lucru și prelevare de material fosil .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Metodologia integrativă de documentare .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Inventarul specimenelor analizate.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Fotogrammetrie.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Morfometrie geometrică.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. MNI .....</b>	<b>5</b>
<b>2.5. Rația sexelor.....</b>	<b>7</b>
<b>2.6. Stadiile de uzură.....</b>	<b>8</b>
<b>2.7. Biocronologia.....</b>	<b>9</b>
<b>2.8. Micro-uzură dentară.....</b>	<b>11</b>
<b>2.9. Osteometrie.....</b>	<b>13</b>
<b>2.10. Prelevare probe os.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Datare cu radiocarbon.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Analize izotopice.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1. Analiza de probare serială și individuală a caninilor și mandibulelor de <i>U. spelaeus</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>5. Analize ADN.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Diseminarea rezultatelor preliminare:.....</b>	<b>19</b>
<b>7. Sumar al progresului .....</b>	<b>21</b>
<b>8. Rezumat executiv al activităților realizate în perioada de implementare.....</b>	<b>22</b>

## **1. Vizite de lucru și prelevare de material fosil**

În perioada raportată (Faza 2 – 2023), am desfășurat vizite de lucru și prelevare de material fosil atât în România, cât și în alte patru țări (Spania, Republica Moldova, Bulgaria și Serbia). Demersul a avut la bază începerea inventarierii și prelevării specimenelor fosile, similare cu fauna analizată în Carpați (pentru a o putea integra într-un cadru regional, mai larg). Pe lângă probarea de specimene fosile din colecția paleontologică a Institutului de Speologie “Emil Racoviță” din București, echipa noastră a colectat un număr mare de probe de urși de peșteră și faună asociată, de vârstă Pleistocen superior, din colecții provenind de la: Institutul de Zoologie al Universității de Stat al Republicii Moldova, Muzeul Național de Etnografie și Istorie Naturală (Chișinău), Muzeul Național de Istorie Naturală din Sofia, Muzeul Carstului Rhodopean din Chepelare (Bulgaria), Departamentul de Arheologie al Facultății de Filosofie (Universitatea din Belgrad), Muzeul de Istorie Naturală (Belgrad), Facultatea de Mine și Geologie (Belgrad). Pe viitor, intenționăm să extindem întregul demers la nivelul zonei balcanice și al Europei Centrale și de Est.

## **2. Metodologia integrativă de documentare**

Unul dintre aspectele inovatoare, asumate, al proiectului INTEGRATE, a fost acela de a realiza o metodologie în vederea documentării și prelevării specimenelor fosile ce urmează a fi analizate. Această metodologie presupune trecerea graduală de la o documentare non-invazivă (*e.g.* scanare, fotografiere) către o prelevare invazivă (*e.g.* tăierea de probe de os pentru analize de izotopi stabili, radiocarbon sau ADN). Această metodologie a fost aplicată sau este în curs de aplicare pentru numeroase situri atât din România cât și din străinătate (Republica Moldova, Bulgaria și Serbia). Această metodologie a presupus parcurgerea următoarelor etape:

**2.1. Inventarul specimenelor analizate.** Acestea au fost caracterizate în baza următorilor parametri: Nr. Crt., Nr. Lab., Nr. Inventar, Nr. IPHES, Sit, Localitate, Sondaj/Săpătură, Nivel/Orizont stratigrafic, Tip specimen/os, Specie, Parte, Sex, Vârstă, Grad de uzură (dentară), Tafonomie, Probe prelevate (tăiate), Foto, Colecție, Observații (Fig. 1).

## Raport științific 01/01 – 31 /12/2023 TE 09/2022 INTEGRATE

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
1	Nr. Crt	Lab #	Inventory no.	#IPHES	Test pit	Level	Bone type	Species	Side	Sex	Age	Stinner age group	Taphonomy	Sampled bones cutted	Photo	Cave/facality	Observations	Responsabil			
37			10704/1005				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	male	?					Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
38			10704/1006				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	?	?					Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
39			10704/1007				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	?	adult			m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
40			10704/1008				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	?	adult			m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
41			10704/1009				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	male	sub-adult			C		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
42			10704/1010				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	?	adult			m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
43			10704/1011				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	female	adult			C		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
44			10704/1012				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	?	adult			m2		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
45			10704/1009				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	male	?					Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
46			10704/1010				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	male	?					Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
47			10704/1011				mandible	<i>U. spelaeus</i>	left	male	subadult			C		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
48			10704/1012				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	male	adult			m2		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
49			10704/1013				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	?	adult			m2-m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
50			10704/1014				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	female	adult			m2-m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
51			10704/1015				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	male	adult			m3; pathology		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
52			10704/1016				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	?	adult			m2-m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
53			10704/1017				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	male	adult			C		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
54			10704/1018				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	male	adult			C		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
55			10704/1019				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	male	adult			C		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
56			10704/1020				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	male	adult			C		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
57			10704/1021				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	male	subadult			C, p4, m2		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
58			10704/1022				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	?	sub-adult			m2-m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
59			10704/1023				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	?	adult			m2-m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
60			10704/1024				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	?	sub-adult			m2-m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
61			10704/1025				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	?	?					Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
62			10704/1026				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	female	?					Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
63			10704/1027				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	female	adult			C root		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
64			10704/1028				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	female	adult			C		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				
65			10704/1029				mandible	<i>U. spelaeus</i>	right	male	adult			m3		Butesti	Muzeul de Etnogr: Elena Delineschi				

Figura.1. Schema inventarului materialului fosil.

**2.2. Fotogrammetrie.** În situații ideale, speciile ce urmează a fi analizate/investigate, sunt integral documentate fotografic, la mare rezoluție, în vederea realizării modelelor tridimensionale (Fig. 2). Analizele ulterioare care la vor fi supuse acestea fie vor altera morfologia originală, fie o vor schimba ireversibil. De aceea, tehnicile de scanare ale acestor specimene sunt foarte utile pentru conservarea, fie ea și digitală, a fosilelor. Până în momentul de față, au fost scanate circa **65 de mandibule** complete de urs de peșteră (*U. spelaeus*), din colecția Institutului de Speologie “Emil Racoviță”, al Academiei Române (ISER). Este cel mai mare număr de fosile de urs de peșteră scanate din istoria cercetării acestei specii. Un material științific prezentând metodologia fotogrammetriei pe baza acestui material și utilitatea demersului sunt într-un stadiu avansat de redactare.

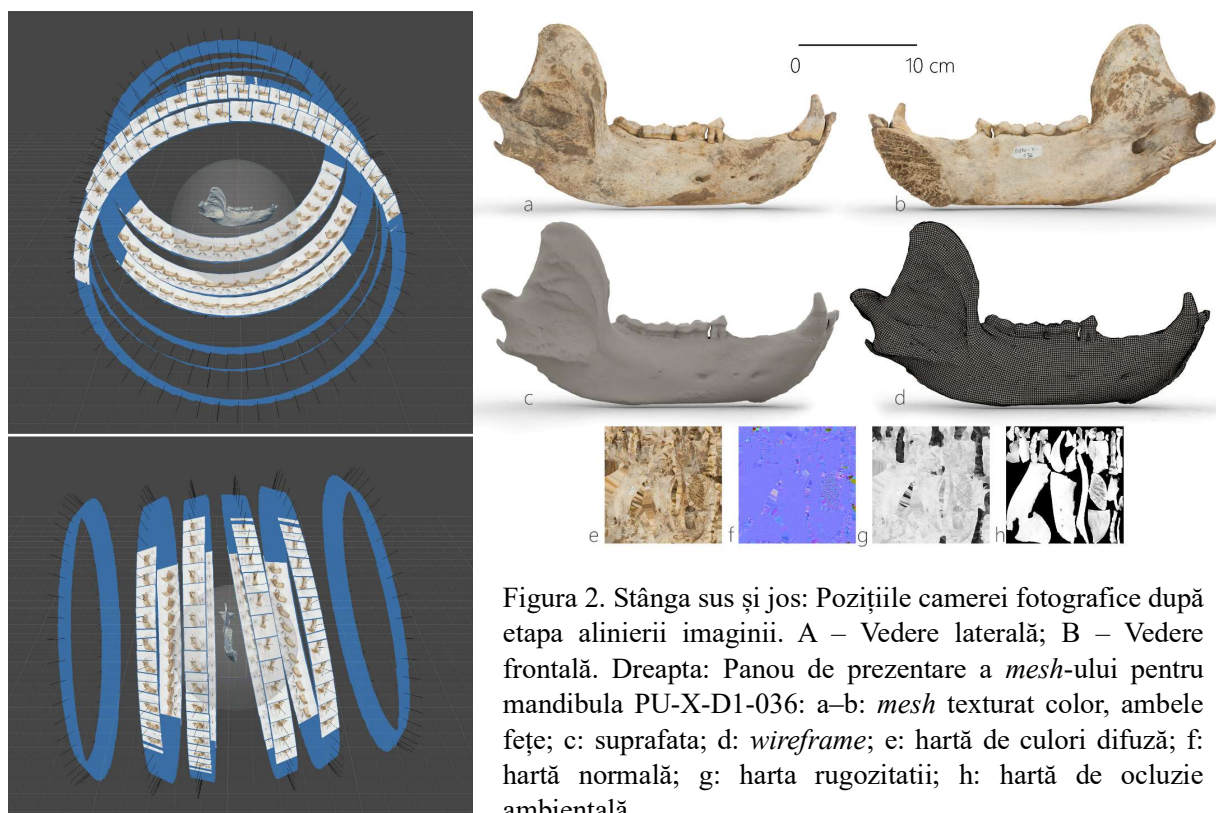


Figura 2. Stânga sus și jos: Pozițiile camerei fotografice după etapa alinierii imaginii. A – Vedere laterală; B – Vedere frontală. Dreapta: Panou de prezentare a *mesh*-ului pentru mandibula PU-X-D1-036: a–b: *mesh* texturat color, ambele fețe; c: suprafața; d: *wireframe*; e: hartă de culori difuză; f: hartă normală; g: hartă rugozității; h: hartă de ocluzie ambientală.

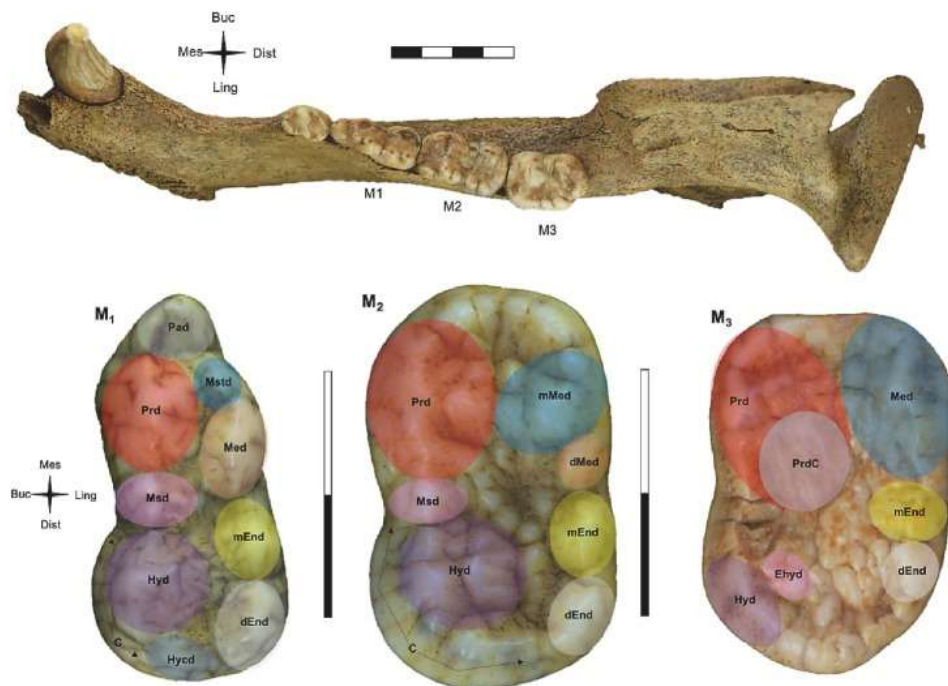
**2.3. Morfometrie geometrică.** Această etapă a presupus fotografierea la mare rezoluție a suprafeței ocluzale a molarilor inferiori (m1-m3), situați în ramusul mandibular al mamiferelor fosile analizate (Fig. 3). Practic, fiecare mandibulă a fost fotografiată de trei ori, din trei unghiuri diferite, pentru a putea fi realizată o imagine tridimensională. Ulterior, imaginile au fost procesate în computer, morfologia de detaliu a suprafețelor de masticție fiind analizată în vederea obținerii de informații calitative și cantitative privitor la paleodieta indivizilor investigați.

**2.4. MNI** reprezintă Numărul Minim de Indivizi al populației analizate. Această metodă, specifică tafonomiei, reprezintă o estimare a unei populații pe baza cuantificării ocurenței numărului de specimene unice, specific unui sistem scheletic (ex. caninul superior stânga, primul molar inferior dreapta, al doilea molar inferior stânga, etc.). Astfel, în măsura disponibilității colecțiilor investigate, pentru a avea o imagine cât mai corectă asupra numărului de indivizi, am analizat atât caninii inferiori și superiori, cât și secvența dentară cuprinsă între premolarul 4 și molarul 3 (p4, m1, m2 și m3; Fig. 4).





Figura 3. *Sus* (stânga și dreapta): etapa de prelevare a datelor (fotografierea la mare rezoluție) a suprafețelor ocluzale ale molarilor m1-m3, ai ursului de peșteră. *Jos*: cuantificarea cuspidelor molarilor analizați (Charters *et al.*, 2018).



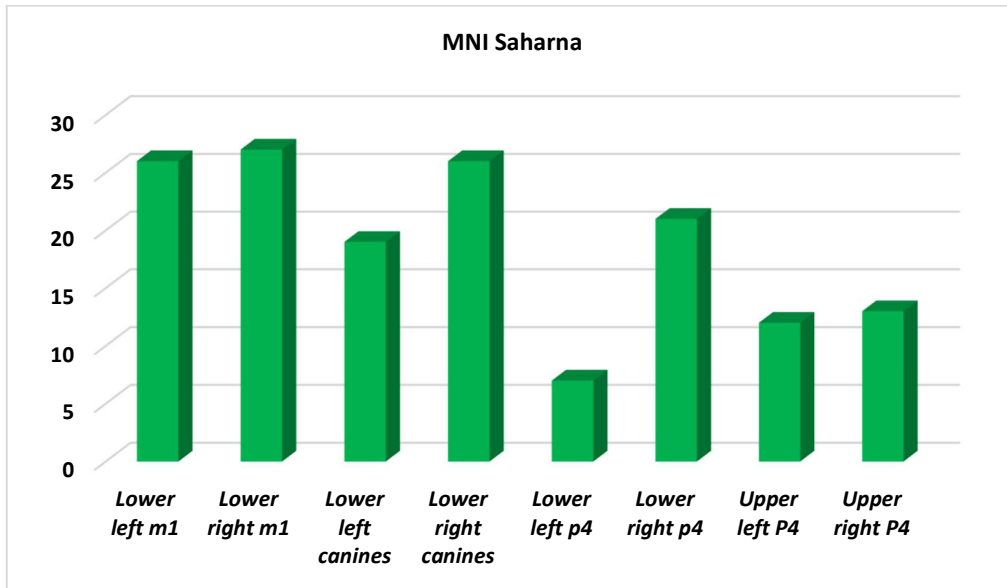


Figura 4. Estimarea numărului de indivizi dintr-o populație de urși de peșteră (Saharna), utilizând metoda MNI pe canini, premolari și molari.

**2.5. Rația sexelor.** Această metodă tafonomică a fost utilizată pentru a determina raportul sexelor (femele vs. masculi), pentru populațiile de urs de peșteră investigate (Fig. 5–7). Pentru acest demers paleoecologic au fost analizați caninii (superiori și inferiori). Este cunoscut faptul că aceste specimene ale scheletului ursidelor prezintă un dimorfism sexual pronunțat și reprezintă un criteriu de diagnostic pentru diferențierea pe sexe. Acest parametru este o sursă importantă de informație paleoecologică, având chiar implicații etologice la nivelul populației și chiar indivizilor.

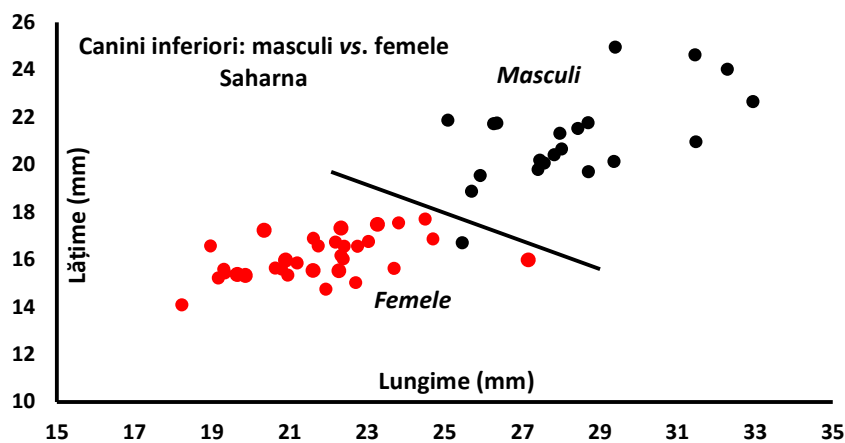


Figura 5. Distribuția sexelor din situl Saharna, pentru *U. spelaeus*

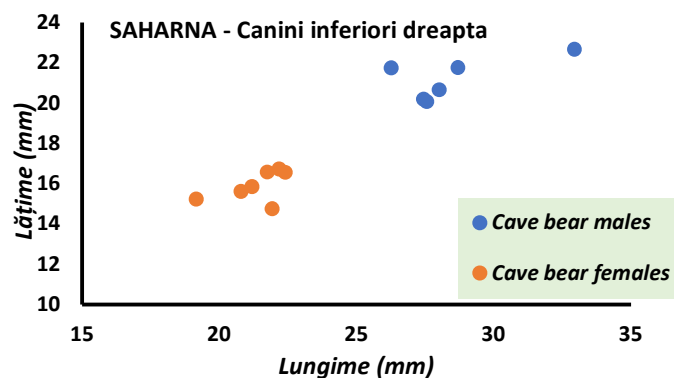


Figura 6. Distribuția sexelor din situl Saharna, pentru *U. spelaeus*, utilizând caninii inferiori dreapta

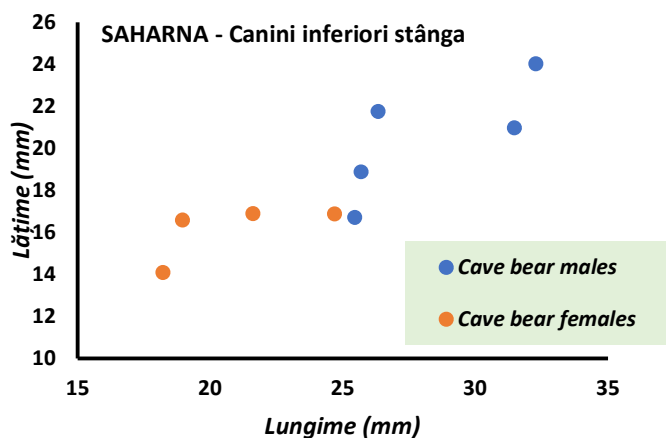


Figura 7. Distribuția sexelor din situl Saharna, pentru *U. spelaeus*, utilizând caninii inferiori stânga

**2.6. Stadiile de uzură** (Stadiile Stinner) reprezintă o metodă tafonomică de cuantificare a uzurii suprafeței ocluzale, la indivizii analizați. Există nouă trepte de uzură dentară a ursidelor (I — IX) care sunt corelate cu vârsta (grupele I-III: juvenili; IV-VII: adulți; VIII-IX: senili; Fig. 8). În urma acestei analize au fost obținute rezultate privitor la curba mortalității populațiilor analizate și a grupelor de vârstă prezente în siturile investigate. În general, acolo unde a fost posibil, au fost analizați molarii inferiori m1, m2 și m3, de pe ambele părți (dreapta și stânga), generându-se șase grafice ale curbei de mortalitate pentru sit (populație). O altă reprezentare grafică foarte importantă pentru stabilirea categoriilor de vârstă și a tipologiei populațiilor de mamifere fosile analizate sunt graficele tripolare (Fig. 9).



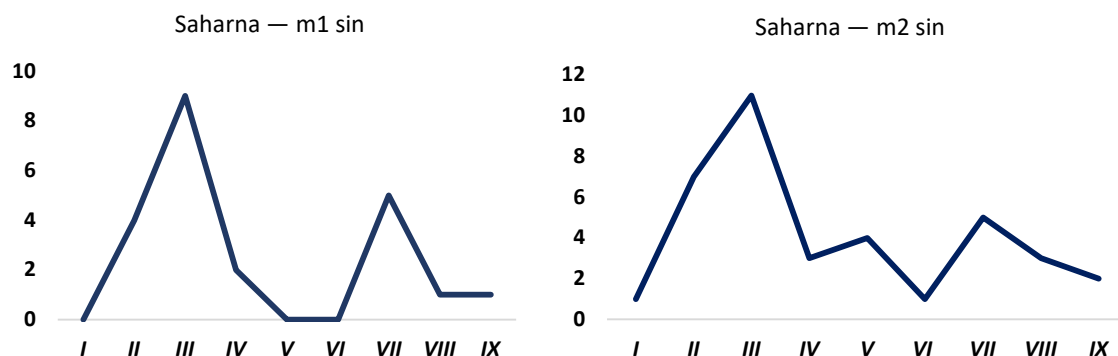


Figura 8. Grupele de vârstă ale *U. speleaeus* de la Saharna. Stânga, utilizând m1 stânga. Dreapta, utilizând m2 stânga.

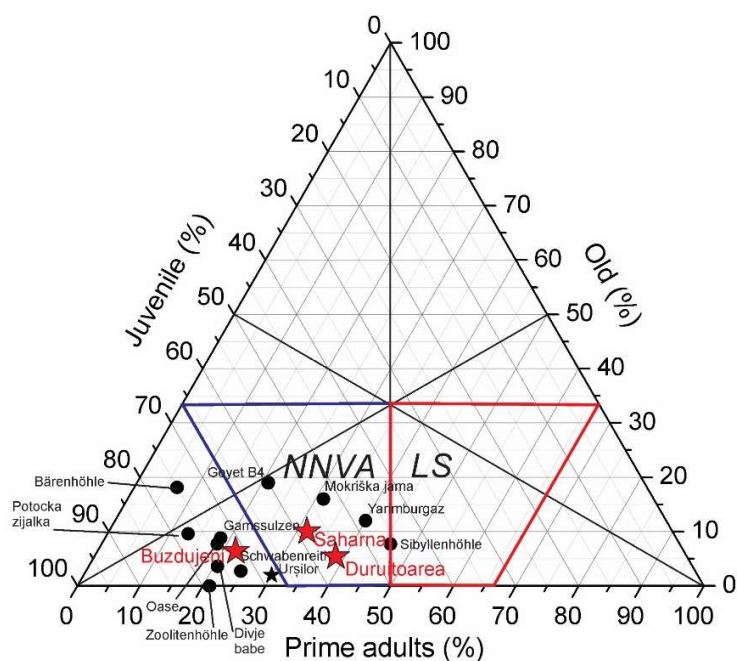


Figura 9. Profilul vârstei populațiilor de *U. speleaeus* din câteva situri analizate, în context regional (European).

**2.7. Biocronologia** speciilor analizate, în special a speciei *U. speleaeus* poate fi stabilită prin utilizarea mai multor metode. Cea mai răspândită este Indexul morfodinamic al p4/4. Aceasta cuantifică gradul de molarizare a premolarului patru (superior și inferior) al urșilor de peșteră, exprimat sub forma unui indice care standardizat cu populația de referință, ne indică, de o manieră general, gradul de evoluție morfologică a unei populații (Tab. 1 și Fig.10). Mai mult, rezultatul

obținut, pus într-un context mai larg, cu populații analizate minuțios, ne poate indica vârsta relativă (cu un anumit grad de eroare; Fig. 11).

<i>p4 inferior</i>					<i>P4 superior</i>				
Morfotip	Număr	Valoare	Produs	Frecvență (%)	Morfotip	Număr	Valoare	Produs	Frecvență (%)
B1	1	0.5	0.5	3.70	B	1	1	1	4.17
B2	2	2	4	7.41	C	2	2	4	8.33
B3	1	2.5	2.5	3.70	A/D	2	1	2	8.33
C1	5	1	5	18.52	D	4	2	8	16.67
C2	8	2	16	29.63	E	7	3	21	29.17
C3	2	3	6	7.41	D/F	5	3	15	20.83
D1	4	1.5	6	14.81	F	3	4	12	12.50
D2	3	2.5	7.5	11.11	TOTAL	24		63	100.00
F3	1	5	5	3.70					
TOTAL	27		52.5	100.00					

Tabelul. 1. Evaluarea biocronologică a unei populații de urside (Saharna), pe baza analizei premolarului patru al urșilor de peșteră.

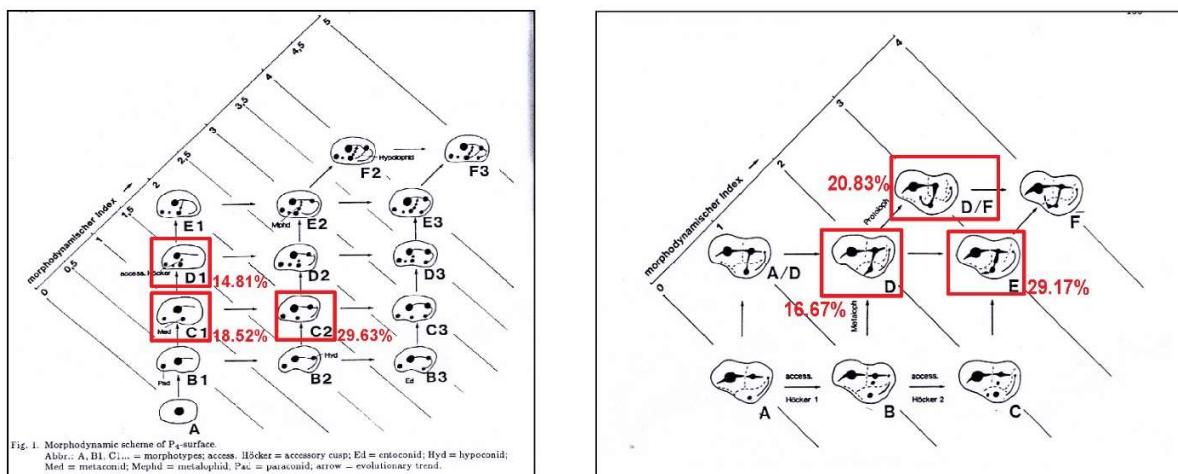


Figura. 10. Morfotipurile dominante ale populației de urși de peșteră, de la Saharna. *Inferior*: p4; *Superior*: P4.

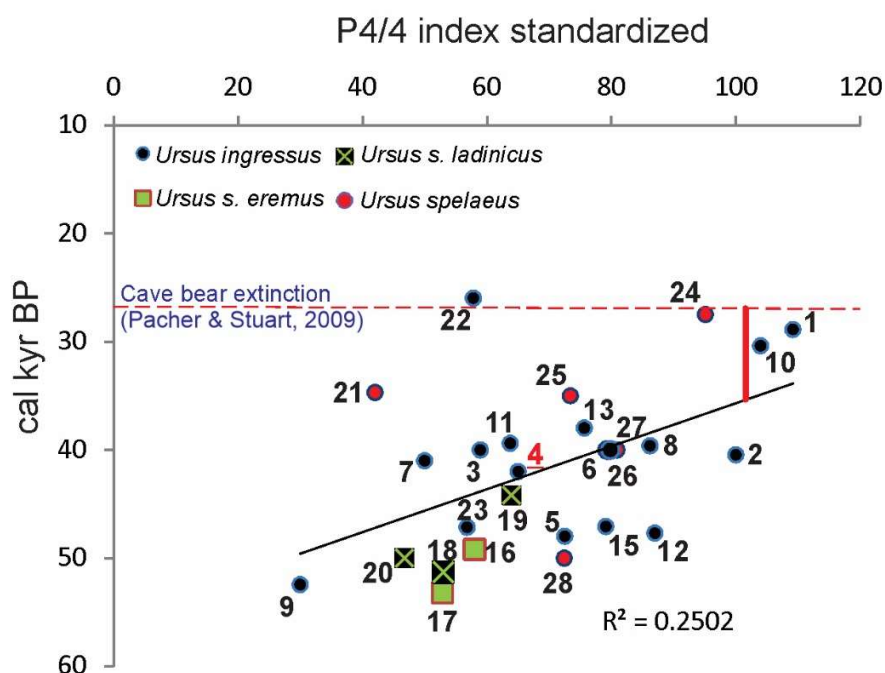


Figura. 11. Evaluarea vârstei populației de urside de la Saharna (linia roșie), pe baza indexului p4/4, în context regional, raportat la scara radiometrică.

**2.8. Micro-uzură dentară.** În intervalul de raportare, echipa noastră a efectuat deplasări în Bulgaria (127 specimene recoltate), Republica Moldova (117 specimene), Serbia (54 specimene) și România (289 specimene) pentru a realiza mulaje ale primului molar inferior, al urșilor de peșteră, în vederea analizei suprafeței ocluzale, ca proxy pentru paleo-dieta acestei specii. A fost probat un total de 587 indivizi (urși de peșteră și faună asociată din regiunea carpatică și din împrejurimile acesteia), de vârstă Pleistocen superioară. Este, de departe, cea cea mai consistentă populație de mamifere fosile analizată, din acest punct de vedere, din Europa. Probele au fost recoltate de echipa ISER iar analiza cantitativă și calitativă a fost realizată de colaboratorii noștri de la Institut Català de Paleoecologia Humana i Evolució Social (IPHES; Fig. 12 – 13).

Probele au fost pregătite urmând protocolul dezvoltat de Solounias și Semprebon (2002) și Semprebon și colab. (2004). Suprafața ocluzală a dinților a fost curățată folosind acetonă apoi etanol 96%. O matriță de înaltă rezoluție a suprafeței ocluzale a fost realizată folosind silicon polivinilsiloxan (Heraeus Provil novo, Light CD2, set obișnuit) și un al doilea strat folosind chit silionic (Heraeus Provil novo, Putty). Formele pozitive au fost produse turnând rășină epoxidică transparentă de înaltă rezoluție (rășină CTS EPO150 + întăritor K151) în formele negative.

Modelele au fost observate folosind un stereomicroscop cu lumină standard (Zeiss Stemi 2000C), la o mărire de  $\times 35$  pentru a identifica și cuantifica micro-caracteristicile suprafeței ocluzale, folosind un reticulul optic de  $0,16 \text{ mm}^2$  (Solounias și Semprebon 2002; Semprebon și colab. 2004). Am examinat suprafețele de smalț nefațetate și măcinate ale molarilor, deoarece acestea oferă cea mai bună reflectare a modurilor alimentației ale specimenelor de urside, în comparație cu alte zone ale suprafeței dintelui (Ungar și Teaford 1996; Münzel și colab. 2014; Pappa 2016; Pappa et al. 2019; Ramírez-Pedraza et al. 2019, 2020, 2022).

Formele microscopice analizate sunt zgârieturile fine și grosiere de pe suprafața molarilor: caracteristici alungite și înguste, care pot fi clasificate fie ca fine (caracterizate prin urme înguste și superficiale) sau grosiere (distinse prin semne mai largi și mai adânci). Numărul de gropi mici și mari: forme circulare sau semicirculare cu lungime și lățime similare. Ele pot fi clasificate fie ca mici, care se caracterizează prin a fi superficiale și care apar ca puncte strălucitoare, strălucitoare, albe, sau mari, care sunt mai largi și mai adânci, reflectând mai puțină lumină. Scorul lățimii zgârieturilor (SWS), care a fost evaluat dând un scor de 0 suprafețelor de smalț cu zgârieturi predominant fine, un scor de 1 suprafețelor cu un amestec de zgârieturi grosiere și fine și un scor de 2 suprafețelor cu zgârieturi predominant grosiere. zgârieturi. De asemenea, am cuantificat numărul de gropi de perforare (morfologie asemănătoare craterului foarte adânc și simetric, cu margini regulate) și numărul de creștături (în formă de crater, dar cu margini neregulate).

Pentru a reconstrui paleodieta populațiilor fosile, rezultatele obținute au fost comparate cu setul de date de referință ale speciilor de urși existente stabilit de Pappa și colab. (2019). Colecția de referință ne-a permis să comparăm urzidele dispărute cu omologii lor vii, strâns înrudiți, *U. arctos*, din diferite regiuni (Kamchatka, Grecia, Europa Centrală, Europa de Nord și America de Nord) și *U. americanus*, din America de Nord. Ambele specii prezintă o varietate reală de preferințe alimentare, inclusiv consumul de vertebrate și nevertebrate. Pentru a preveni orice eroare inter-observator, un observator unic (PDI) a efectuat analiza tuturor specimenelor.

Graficele au fost generate folosind software-ul Past 4.02 (Hammer et al. 2001) și RStudio (versiunea 4.1.2) (RStudio Team, 2021). Fotomicrografiile au fost capturate folosind o cameră digitală Invenio 5SII, în modul de focalizare extinsă și software-ul Helicon Focus. Astfel, au fost combinate imaginile realizate la diferite planuri focale, pentru a crea o singură imagine cu adâncime de câmp crescută. Barele de scară au fost încorporate folosind software-ul ImageJ.



Figura 12. De la stânga la dreapta: curățarea cu acetona și etanol a suprafeței ocluzale; mularea suprafeței primilor molari inferiori cu silicon polivinilsiloxan; mularea cu chit siliconic; exemplu de suprafață ocluzală mărită la stereoscop pentru analiza micro-formelor generate de masticație.

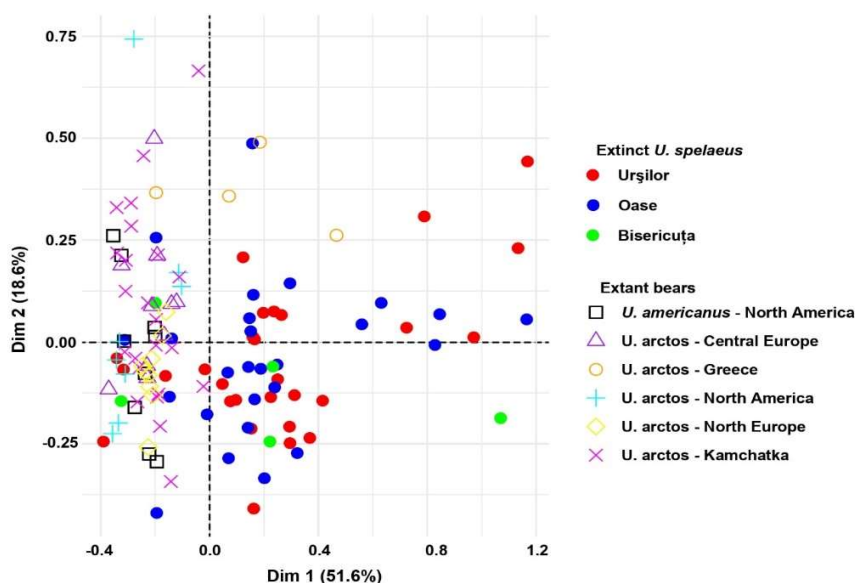


Figura 13. Analiza corespondenței (CA) bazată pe șapte variabile: numărul de zgârieturi fine și grosiere, gropi mici și mari, creștături, gropi de perforare și scorul lățimii zgârieturilor. Compararea populațiilor fosile de *U. spelaeus* din peșterile Urșilor, Oase și Bisericuța cu urșii moderni.

## 2.9. Osteometrie

Peste 100 de mandibule, din colecția ISER, din peșterile Urșilor, Muierilor, Ponor Plopa, Onceasa, La Adam și Bisericuța, ce aparțin speciilor *U. spelaeus* și *U. arctos*, au fost măsurate din punct de vedere osteometric. Pentru fiecare mandibulă completă protocolul prevede un număr de 27 de măsurători (Fig. 14). De asemenea, au fost măsurate caninii și molarii 1 inferiori. Acestea au fost realizate cu șublerul analogic și electronic (rezoluție  $\pm 0.05$  mm). Deasemenea, toate mandibulele complete, caninii și molarii din colecțiile vizitate (R. Moldova, Bulgaria și Serbia) au fost realizate conform protocolului amintit și urmează a fi integrate în baza de date a proiectului (Fig. 15).

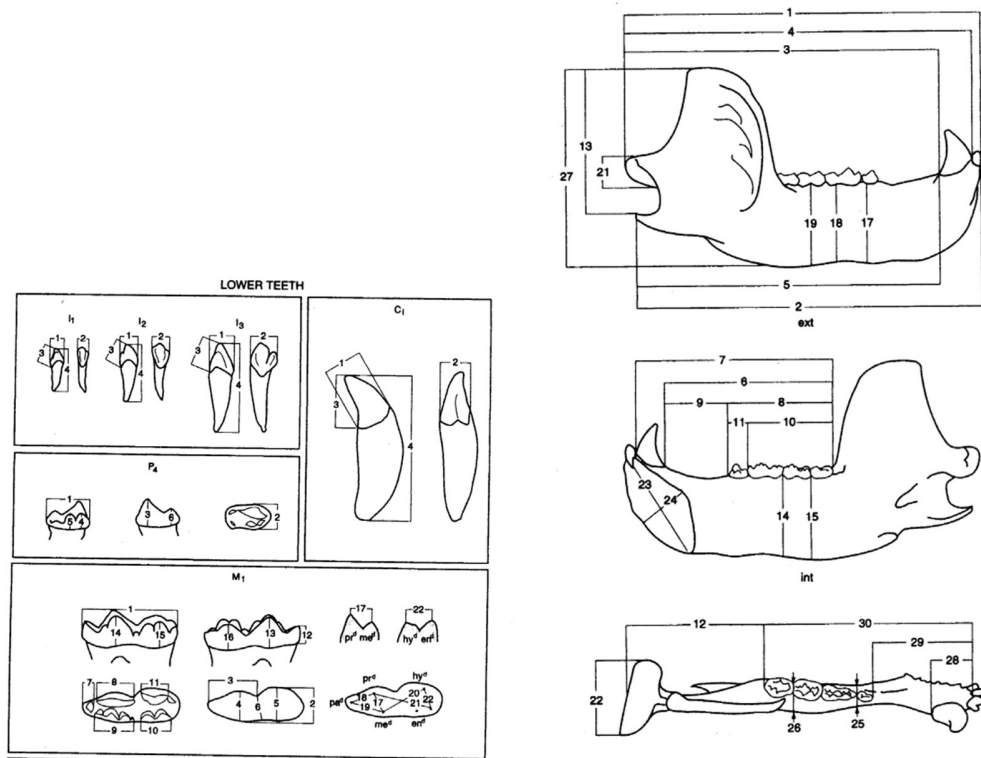


Figura 14. Protocolul de măsurători osteometrice Tsoukala și Grandal D'Anglade (2002). Stânga – măsurători pentru canini, premolar și primul molar inferior. Dreapta – măsurători pentru mandibulă.

#ERIS	Lcond-ld	Lpro.ang-ld	Lcond-Cp.	Lcond-Ca.	Lpro.ang-Cp.	LCp-Mp.	Lca-Mp.	LP4-M3	Ldiast.	LM	LP	Lcond-Mp.	H pro.ang-Cor.	Hmd.(M1p.	
5	PB/B1-XI	249,62	243,5	217,46	215,6	209,42	132,14	153,12	88,06	43,91	72,6	14,46	85,7	82,13	48,36
6	PB/C1-IX						158,8	186,6	103,82	55,74	87,27	14,98			63,14
7	PB/C1-XII-XIII	288,92	289,02	255	278,8	255,5	144,5	169,34	97,7	48,83	80,32	15,4	107,17	116,62	61,1
8	PB/C1-VIII-IX														53,99
9	PM/Q6-V-VI	284,5	271,18	248,1	271,48	236,08	143,06	171	83,1	46,35	68,61	5,05	103,67	117,1	52
10	PM/Q6-0-89	301,68	297,11	264,81	286	253,38	151,6	172,66	110,18	45,35	92,08	17,25	113,97		74,26
11	PM/R6+73						137,8	165	100,06	42,03	84,46	12,47			56,3
12	PM/S6-II-III												117,54		
13	PU/U6-III-IV												113,55		
14	PM/S6-I-II														65,01
15	PM/W6-III-IV						165	182,48							70,63
16	PU/FS1								109,47		90,3	17,79			
17	PM/U6+41	278,8	278,28	250,6	267,36	250,5	146,48	160,1	101,78	45,04	82,96		102,11		61,18
18	N34.139						171,18	205,16	110,32	63,33	90,23	23,9			81,83
19	O34.52a	323,46	318	283,28	303,46	282,6	154,7	181,64	103,82	55,56	94,46		132,81		76,36
20	O34.180	347,5	339,12	304,6	342,16	293	172,38	205,7	114,15	59,25	93,59	17,55	1239,51	155	78,31
21	N32.27										95,36			142,2	78,66
22	N35.143						18,26	21,1	111,44	66,99	97,54	16,66			99,12
23	N36.260	357,5	356	306,18	331,7	297,96	174,5	209,9	107,36	70,48	84,07	24,32	133,12		
24	O35.138						172,96	209	118,08	57,84	95,9	21,33			76,64

Figura 15. Baza de date a proiectului INTEGRATE, cu măsurătorile osteometrice ale materialului aflat în inventarul ISER.



### 2.10. Prelevare probe os

În perioada raportată (1/01 – 31/12/2023) au fost recoltate circa 300 de probe de os mandibular, aparținând atât urșilor de peșteră, cât și speciilor de mamifere asociate, din depozite carstice, din situri localizate în România, Republica Moldova, Bulgaria și România. Prelevarea s-a făcut prin tăiere mecanică, cu un instrument de tip BOSCH DREMEL 3000, cu disc diamantat (Fig. 16). Între fiecare probare, protocolul a prevăzut sterilizarea suprafețelor de tăiere, a discului diamantat, a dremelului și curățarea echipamentului de protecție. Aceste probe au fost selectate pentru diferite analize (radiocarbon, izotopi stabili, ADN), ca parte finală a protocolului integrat de documentare și probare a speciilor fosile. Pentru conservarea colagenului din probe, acestea au fost depozitate în frigider, la o temperatură de cuprinsă între 4–6°C.



Figura 16. Probarea ramusului mandibular, prin tăiere mecanică, cu BOSCH DREMEL 3000, cu disc diamantat, din diverse colecții paleontologice.

### 3. Datare cu radiocarbon

În anul 2023, au fost trimise la Poznan (PRL), pentru datarea cu radiocarbon, 33 probe de urs de peșteră, de vârstă Pleistocen superior din Carpații Românești (Peștera Urșilor, Muierilor, Oase, Biseriçuța). De asemenea, un număr de cinci probe de mamifere, presupuse a avea aceeași vârstă, din Republica Moldova, sunt în curs de datare la laboratorul de radiocarbon din Oxford (ORAU).

Dintre probele trimise la PRL, șapte probe nu au avut un raport C:N satisfăcător, patru probe au livrat vârste dincolo de limita de detecție a radiocarbonului și patru au avut un conținut al colagenului mai mic de 0.7%. Astfel că din 33 de probe, cel puțin 21 rezultate sunt eligibile pentru

investigațiile noastre. La acestea, putem adăuga alte opt probe de urs de peșteră date tot la ORAU (plată angajată în 2022), rezultate care ne-au parvenit în Aprilie 2023. Dintre acestea, patru rezultate sunt situate dincolo de limita radiocarbonului, două au avut un conținut al colagenului sub 0.7%.

În concluzie, în anul 2023, au fost date cu radiocarbon **41** de probe de urs de peșteră, din care **27** au livrat vârste acceptabile (din punctul de vedere a acurateții procesului de datare) și publicabile. Vârstele obținute, pentru fauna analizată, sunt cuprinse între *ca.* 50 și 30 kyr cal BP și se înscriu cronologic în Stadiul Izotopic Marin 3 (57—29 ka).

#### 4. Analize izotopice

##### 4.1. Analiza de probare serială și individuală a caninilor și mandibulelor de *U. spelaeus*.

Șase ( $N = 6$ ) secțiuni de canini, de urs de peșteră au fost trimișe pentru analiza serială a izotopilor de carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) și oxigen ( $\delta^{18}\text{O}$ ). Anterior, în 2019, acești canini au fost datați și probele au fost prelevate macroscopic (micro-Dremmel), pentru analiza acelorași parametri ( $\delta^{13}\text{C}$  și  $\delta^{18}\text{O}$ ; Robu *et al.*, 2019). De această dată, însă, analiza carbonului și oxigenului se va realiza din fosfatul stratelor dentinei, prin ablație laser. Avantajul ablației laser consta în faptul că oferă o rezoluție net superioară prelevării macroscopice (*ca.* 5-7 probe vs., 10-30 probe, respectiv). Sunt previzionate *ca.* 180 de măsurători pentru fiecare dintre cei doi parametri. În momentul de față, am primit rezultatele parțiale pentru carbon (e.g. Fig. 17–18), urmând ca datele pentru oxigen să fie livrate anul viitor. Deasemenea, datele de  $\delta^{13}\text{C}$  și  $\delta^{18}\text{O}$  ce provin din măsurătorile a 100 de probe de os mandibular, de *U. spelaeus*, urmează a fi livrate în cursul anului următor, în prima parte.

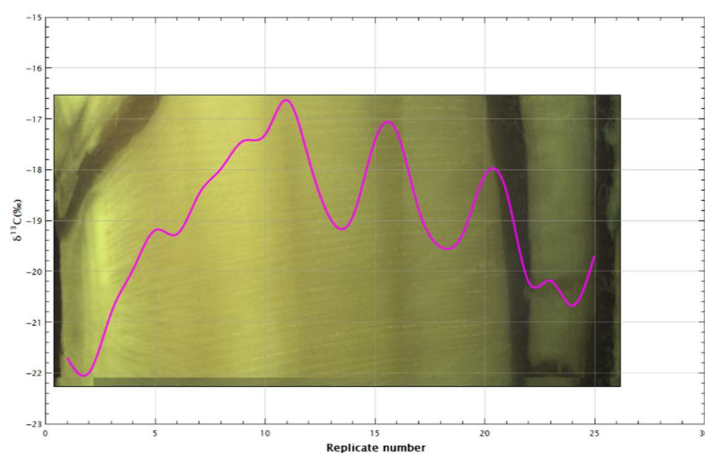


Figura 17. Profilul variației de  $\delta^{13}\text{C}$  pentru proba PC/059, un canin provenind de la Peștera Cioclovina.

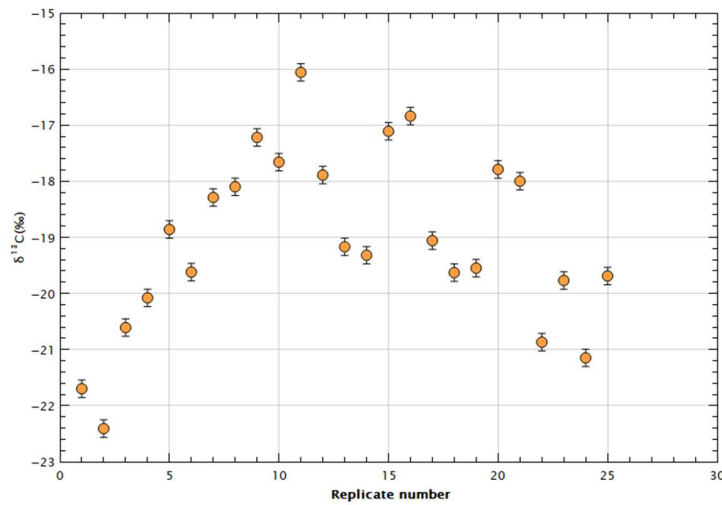


Figura 18. Datele de  $\delta^{13}\text{C}$  pentru proba PC/059.

## 5. Analize ADN

Scopul principal al acestor analize a fost acela de a identifica taxonomic probe de os, de *U. spelaeus*, de la peșterile Urșilor și Muierilor, pe baza analizei ADN-ului mitocondrial (*mtDNA*). Analizele au fost realizate de colaboratorii noștri, la Laboratorul de Paleogenetică și Genetica Conservării, a Universității din Varșovia. Extracția ADN-ului a fost efectuată urmând protocolul lui Rohland *et al.* (2018). Bibliotecile monocatenare dublu indexate au fost generate urmând protocolul lui Gansauge *et al.* (2020). Această abordare face ca deteriorarea ADN-ului caracteristică pentru ADN-ul vechi să fie limitată la nucleotidele terminale ale moleculelor de ADN. S-a folosit captura de hibridizare (Horn, 2012) pentru a îmbogăți bibliotecile de secvențiere în moleculele de ADN mitocondrial al ursului (*mtDNA*). Secvențierea a fost efectuată atât cu platformele NovaSeq, cât și cu NextSeq. Citirea secvențierii brute a fost realizată prin filtrarea cu ajutorul AdapterRemoval2 (Schubert *et al.*, 2016). Am utilizat Burrows-Wheeler Aligner (Li & Durbin, 2009) pentru a cartografi citirile filtrate la fiecare probă de urs de peșteră (NC\_011112) sau urs brun (NC\_003427), genomii de referință *mtADN*. Două eșantioane cu cea mai mare acoperire (CB001 și CB007) au fost selectate pentru a genera un arbore filogenetic folosind un set de date inclus în Gratzinger *et al.* (2019). Două specimene moderne, identificate ca *Ursus arctos* au fost adăugate ca un grup extern (ID-uri GenBank: HQ685948.1

Secvențele au fost aliniate folosind alinierea MAFFT (Kato *et al.*, 2002). Probabilitatea Maximă a Filogeniei a fost reconstruită folosind IQtree-2 (Minh *et al.*, 2020). Suportul nodului a fost

evaluat folosind un bootstrap ultrarapid. Topologia arborelui este în concordanță cu rezultatele publicate de Gratzinger *et al.* (2019) cu cele două haplogrupuri majore de *mt* ADN desemnate anterior taxonomic ca *Ursus ingressus* și *Ursus spelaeus* (inclusiv *U. s. eremus*, *U. s. ladinicus* și *U. s. spelaeus*) și trei filiații ale *U. ingressus* (grupul Europei de Vest, Central și Sud-Est). Probele CB001 și CB007 (Urșilor ) au fost localizate în interiorul ramurei *U. ingressus* Central European (Fig. 19).



Figura 19. Probabilitate maximă de filogenie a urșilor de peșteră eurasiatici, bazată pe genomi *mt*DNA. Secvențele din setul nostru de date sunt marcate cu o săgeată.

## 6. Diseminarea rezultatelor preliminare:

În perioada de raportare, atât site-ul cât și blogul proiectului INTEGRATE au fost active, încercând să aducem către marele public rezultatele cercetării noastre (<https://www.eris-integrate.com/ro>). Din păcate, din motive necunoscute și care nu au ținut de echipa noastră, pagina de Facebook a INTEGRATE a devenit inutilizabilă.

În luna noiembrie, directorul de proiect, Dr. Marius Robu a oferit un interviu canalului de Youtube In Perspectiva.ro în care s-au prezentat numeroase informații despre domeniul nostru de activitate dar și despre proiectele noastre de cercetare:

Episodul 1: [https://www.youtube.com/watch?v=OkeZQ9cu8tE&t=9s&ab\\_channel=InPerspectiva](https://www.youtube.com/watch?v=OkeZQ9cu8tE&t=9s&ab_channel=InPerspectiva);

Episodul 2: [https://www.youtube.com/watch?v=uCdxxalXyGw&t=287s&ab\\_channel=InPerspectiva](https://www.youtube.com/watch?v=uCdxxalXyGw&t=287s&ab_channel=InPerspectiva).

Privitor la diseminarea în plan științific a datelor obținute până acum, în cadrul proiectului, raportăm participarea la mai multe conferințe, atât din țară cât și din străinătate:

- a. **Ionuț-Cornel Mirea, Marius Robu, Alexandru Petculescu, Luchiana Faur, Silviu Constantin.** *Deciphering climate variability by studying Late Pleistocene cave infillings. Case study: Muierilor Cave, Romania.* XXI INQUA Congress 2023, 14-20 Iulie 2023, Sapienza University of Rome, Italia.
- b. **Marius Robu, Ionuț-Cornel Mirea, Theodor Obadă, Vitalie Burlacu.** *The taphonomy of the MIS 3 cave bear bone assemblages from several key sites of the Republic of Moldova.* Conferința Științifică - Istorie - Arheologie - Muzeologie - a Muzeului Național De Istorie a Moldovei (ediția a XXXIII-a) 26-27 octombrie 2023, Chișinău (Republica Moldova).
- c. Ștefan Vasile, **Alexandru Petculescu, Valentin Dumitrașcu, Marius Robu, Marian Cosac, George Murătoareanu, Daniel Vereș.** *Asociațiile de vertebrate fosile din siturile paleolitice din Cheile Vârghișului (Carpații Orientali, România) – stadiul actual al cunoștințelor.* Simpozionul Național „Grigore Cobălcescu”, 28 octombrie 2023, Iași.
- d. Daniel Vereș, Marian Cosac, George Murătoareanu, Ștefan Vasile, Alexandru Petculescu, Valentin Dumitrașcu, **Marius Robu, Loredana Niță.** *Middle Palaeolithic cave sequences in Eastern Transylvania, Romania.* Wokshop Karsthives 2, 20-21 Aprilie 2023, Chișcău (Bihor).
- e. **Ionuț-Cornel Mirea, Marius Robu, Alexandru Petculescu, Marius Kenesz, Luchiana Faur, Răzvan Arghir, Silviu Constantin.** *Late Pleistocene climate evolution in the Southern*

*Carpathians recorded by cave deposits from Muierilor cave system (Romania)*. Wokshop Karsthives 2, 20-21 Aprilie 2023, Chișcău (Bihor).

f. **Marius Robu, Ionuț-Cornel Mirea, Alexandru Petculescu**, Marius Kenesz, **Luchiana Faur**, William Pestle, Peter K. Swart, Silviu Constantin. *Palaeodiet and palaeoecology of a complex Late Pleistocene mammal association in the Romanian Carpathians*. Wokshop Karsthives 2, 20-21 Aprilie 2023, Chișcău (Bihor).

g. **Marius Robu, Ionuț-Cornel Mirea, Alexandru Petculescu**, Marius Kenesz, **Luchiana Faur**, Laura Tîrlă, Oana-Teodora Moldovan, Silviu Constantin. *Cave bear of Romania – A comprehensive view*. Wokshop Karsthives 2, 20-21 Aprilie 2023, Chișcău (Bihor).

În luna noiembrie 2023, echipa noastră, împreună cu colaboratorii din Spania (IPHES), a trimis către review, în vederea publicării, un manuscris (cu date generate 100% în cadrul INTEGRATE), intitulat *The palaeodiet during the pre-dormancy period of the MIS 3 Romanian cave bears as inferred from microwear analysis*, autorată de Paulo Duñó-Iglesias, Iván Ramírez-Pedraza, Florent Rivals, **Ionuț-Cornel Mirea, Luchiana Faur**, Silviu Constantin și **Marius Robu** la Jurnalul *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* (Q1).

De asemenea, echipa noastră are în lucru, sub egida INTEGRATE, nu mai puțin de șapte manuscrise, aflate în diverse stadii de elaborare.



## 7. Sumar al progresului

**Livrabile (D) și borne (M)** (Fig. 20):

**WP1)** D1.1: Brainstorming și discuții interne pe marginea proiectului (fiecare lună); D1.2: Întâlnire pentru monitorizarea progresului (Iunie 2023) ✓;

**WP2)** M2.1: Task-urile 2.1 – 2.9 au fost demarate și sunt în curs de realizare/finalizare (în diferite stadii) ✓;

**WP3)** M3.1: probele pentru datarea cu radiocarbon au livrat deja rezultate ✓; M3.2: rezultatele valorilor izotopice pentru  $\delta^{18}\text{O}$  și  $\delta^{13}\text{C}$  sunt în curs de livrare; M3.3: Datare cu succes a unui număr de 27 de probe de os fosil ✓. M3.4: Elaborarea metodologiei integrative în curs ✓.

**WP4)** D4.1: Participare la conferințe naționale și internaționale ✓; D4.2: scriere și trimitere articole la publicat ✓.

**WP5)** D5.3: Training în tehnici specific de laborator la colaboratori (izotopi stabili, microuzură dentară, statistică) ✓.



Fig. 20. Diagrama Gantt pentru TE 09/2022 – INTEGRATE

## 8. Rezumat executiv al activităților realizate în perioada de implementare

Realizarea/consolidarea unei rețele de colaboratori externi și interni de la: Institutul de Zoologie al Universității de Stat al Republicii Moldova, Muzeul Național de Etnografie și Istorie Naturală (Chișinău), Muzeul Național de Istorie Naturală din Sofia, Muzeul Carstului Rhodopean din Chepelare (Bulgaria), Departamentul de Arheologie al Facultății de Filosofie (Universitatea din Belgrad), Muzeul de Istorie Naturală (Belgrad), Facultatea de Mine și Geologie (Belgrad) Institut Català de Paleoecologia Humana i Evolució Social (IPHES; Spania), Haifa University și Tel Aviv University (Israel), Liverpool John Moores University (Marea Britanie), École Normale Supérieure de Lyon (Franța), University of Warsaw (Poland), Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Optoelectronică, Universitatea din București, Universitatea “Babeș-Bolyai” Cluj, Terra Analitic (Alba-Iulia). Trimitere probe la diverse laboratoare pentru analize de: micro-uzură dentară (IPHES – 587 probe), izotopi stabili (Terra Analitic, ENSL – ca. 400/80 probe), radiocarbon (ORAU, PRL – 41 de probe), metagenomică (University of Warsaw și Tel Aviv University; 7 probe). Deplasare în Spania, Republica Moldova (trei deplasări), Bulgaria (două deplasări), Serbia (o deplasare), România (o deplasare) – stagii de pregătire, prelevare probe și *networking*. Participarea la patru manifestări științifice științifice. Pregătirea a opt manuscrise științifice ce urmează a fi trimse spre publicare în cursul anului viitor. Trimiterea la publicare a unui manuscris.

**Director proiect**

**Dr. Marius Robu**

27.11.2023

