

O ABORDARE METODOLOGICĂ
INTEGRATIVĂ PENTRU
MONITORIZAREA ȚESTOASEI
DOBROGENE (*TESTUDO GRAECA*)

RAPORT INTERMEDIAR I



ÎNTOCMIT:
DR. STĂNESCU FLORINA
DR. IOSIF RUBEN
DRD. VLAD SABINA ELENA



IULIE 2023
CONSTANȚA

RAPORT INTERMEDIAR I pentru perioada 11 Aprilie – 31 Iulie 2023

1. Titlul proiectului: O abordare metodologică integrativă pentru monitorizarea țestoasei dobrogene (*Testudo graeca*)

1.1. Domeniul științific: Științe biologice

1.2. Echipa:

Director de proiect: Dr. habil. Stănescu Florina

Membru: Dr. Iosif Ruben

Membru: Drd. Vlad Sabina Elena

Colaboratori: Drăgan Ana Maria, Dr. Chergui Brahim

2. Scop și obiective:

Proiectul de față își propune să integreze o serie de metode clasice și moderne cu **scopul** de a îmbunătăți programele de monitorizare și conservare a țestoasei dobrogene (*Testudo graeca*) (**Figura 1**). Mai exact, ne-am propus următoarele două obiective:

O.1. Calibrarea metodelor moderne (capturare-marcare-recapturare prin fotoidentificare) cu cele clasice (sclerocronologia) folosite în monitorizarea dinamicii parametrilor populaționali.

O.2. Evaluarea potențialului metodelor acustice pasive și a algoritmilor de detecție automată pentru monitorizarea populațiilor de țestoasă dobrogeană.

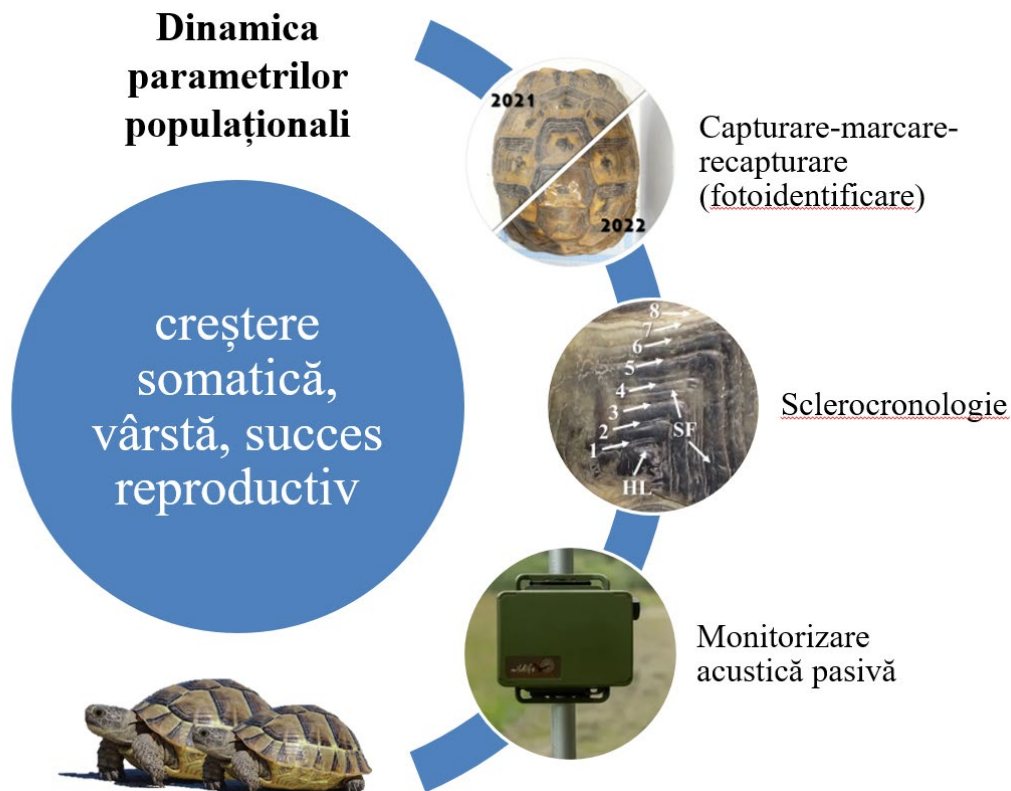


Figura 1. Abordare metodologică integrativă propusă pentru îmbunătățirea programelor de monitorizare și sprijinirea eforturilor de conservare pentru țestoasa dobrogeană (*Testudo graeca*).

3. Activități realizate pentru atingerea obiectivelor:

Activitatea 1. Estimarea vârstei. Am analizat structurile osoase provenind de la carcase colectate în intervalul 2018-2021 din zona de studiu (**Figura 2**, Vlad și colab. 2020), aflate în colecția Departamentului de Științe ale Naturii al Universității „Ovidius” Constanța. Am selectat structuri osoase diferite pentru estimarea vârstei prin scheletocronologie. Pentru aceasta, am aplicat un protocol standard pentru criotomie, adaptat după Stănescu și colab. (2016): decalcifiere - includere - secționare - spălare – colorare - spălare, unde timpii necesari fiecărei etape au fost ajustați în funcție de mărimea și densitatea țesutului osos. Secțiunile cu cel mai mic diametru al cavității medulare și cea mai mare suprafață a periosteumului au fost fixate permanent, iar preparatele finale au fost analizate cu ajutorul softului Quick Photo Micro v. 2.3.



Figura 2. Carcase de țestoasă dobrogeană (*Testudo graeca*) colectate în intervalul 2018-2021 din zona de studiu, utilizate pentru sclerochronologie.

Estimarea vârstei s-a realizat prin numărarea inelelor de creștere din câte 2-5 secțiuni din regiunea centrală a diafizei, pentru fiecare individ (**Figura 3**). Vârsta maturității sexuale a fost estimată pe baza modelului de dispunere a inelelor, distanța dintre două inele fiind un indicator al ratei de creștere (exponențială în etapa juvenilă, redusă în etapa de adult) (Castanet, 1994).

O parte din carcările colectate provin de la indivizi marcați în cadrul studiului pe termen lung de capturare-marcare-recapturare (CMR) inițiat în 2010. Astfel, am utilizat aplicația Wild-ID (**Figura 4**) pentru a identifica acești indivizi în baza de date cu imagini pentru această populație (i.e., 773 imagini, 2010-2022). În plus, am selectat un eșantion adițional de indivizi unici capturați la momente de timp diferite, pentru a fi utilizați pentru estimarea parametrilor populaționali prin analiza scuturilor cornoase. Timpul scurs între capturi a fost utilizat pentru calibrarea rezultatelor obținute prin cele două metode de estimare a vârstei.

Metodologia pentru estimarea vârstei pe baza creșterii țesutului cornos (plastron și carapace) a urmat protocolul propus de Castanet și Cheylan (1979). Pe baza fotografiilor digitale, fiecare inel de creștere a fost considerat ca fiind corespunzător perioadei dintre două hibernări (un an de viață) (**Figura 3**). Interpretarea vârstei la care s-a atins maturitatea sexuală s-a realizat similar metodei descrise pentru țesutul osos. Vârsta individuală a fost estimată pe baza fotografiilor de două ori: la momentul primei capturi și la ultima captură.

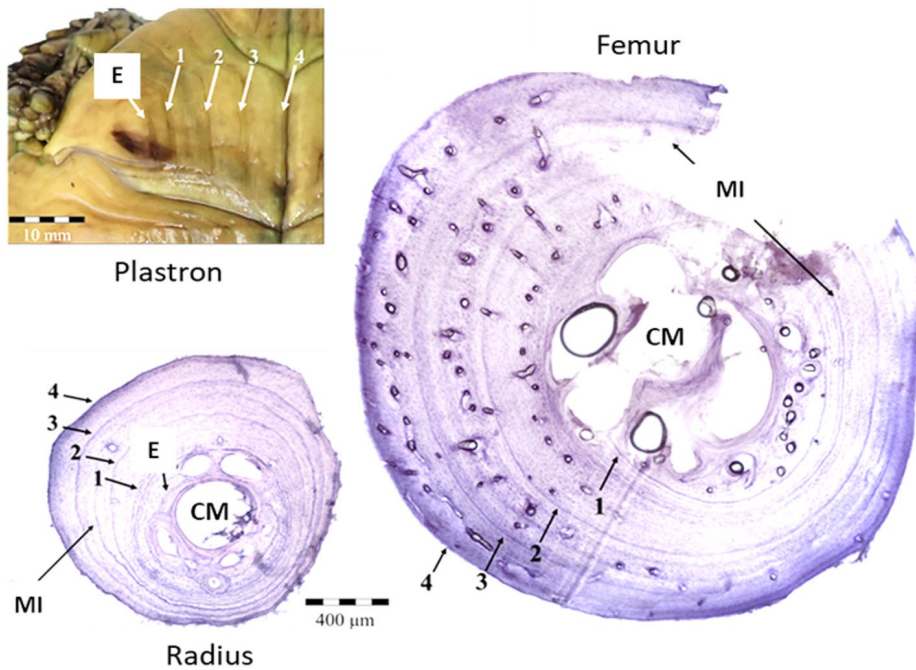


Figura 3. Estimarea vârstei la țestoasa dobrogeană (*Testudo graeca*) prin două metode, aplicate pe structuri diferite la același individ (carcasă de subadult, 4 ani): scheletocronologie (secțiuni prin radius și femur) și numărarea inelelor de creștere pe carapace (plastron). E = marker eclozare, CM = cavitatea medulară, MI = marker inter-anual.

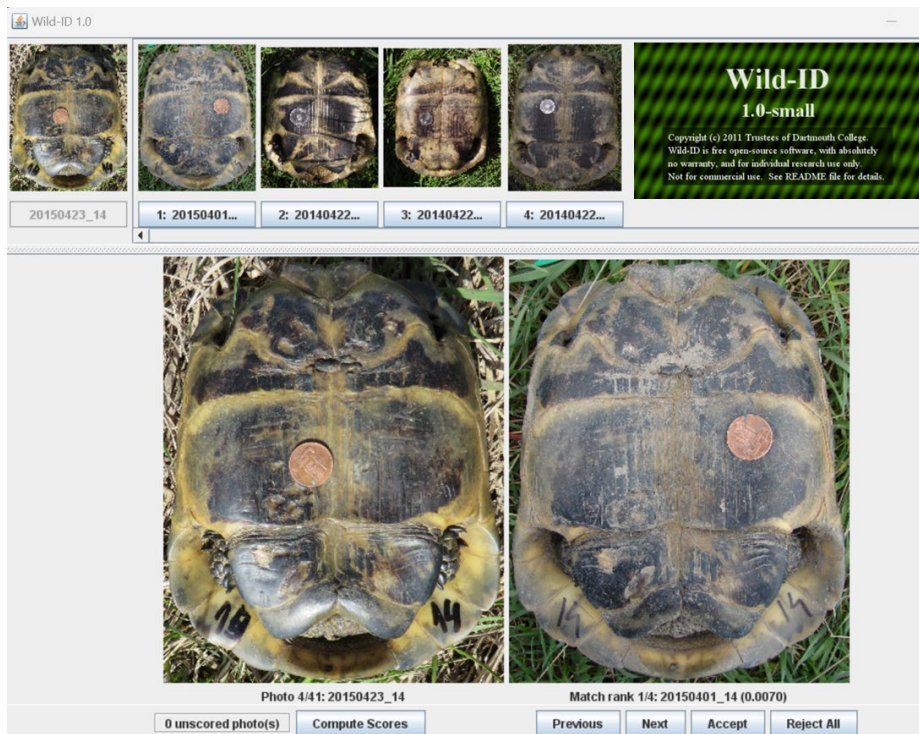


Figura 4. Identificarea indivizilor pe baza fotografiilor, cu ajutorul aplicației Wild-ID.
Activitatea 2. Calibrarea parametrilor populaționali cu ajutorul metodei de captura-marcare-recaptura (CMR).

Am evaluat acuratețea parametrilor obținuți prin scheletocronologie și prin analiza scuturilor cornoase, prin raportarea la timpul scurs între data primei și ultimei capturi pentru fiecare individ unic. Am analizat diferențele în parametrii de vârstă obținuți prin cele două metode. Am utilizat timpul scurs între capturi ca și metodă suplimentară de control, pentru a obține o estimare robustă a vârstei individuale:

$Vârsta_{calibrare} = Vârsta \text{ estimată la prima captură} + \text{timpul scurs între prima și ultima captură}$.
Am evaluat diferențele între $Vârsta_{calibrare}$ și vârsta estimată la ultima captură, clasificând estimările de vârstă ca fiind “precise” (zero diferențe) sau “imprecise” (există diferențe). Am analizat aceste date cu ajutorul unei regresii logistice pentru a determina cauzele potențiale privind acuratețea estimărilor de vârstă.

Am caracterizat modelele de creștere folosind ecuația lui von Bertalanffy (1938):

$$LCC_t = LCC_{max} - (LCC_{max} - LCC_0) \times e^{-k \times t}, \text{ unde:}$$

LCC_t reprezintă lungimea curbă a carapacei, măsurată de la vârful scutului nucal până la capătul scutului supracaudal la momentul (sau vârsta) t , LCC_{max} reprezintă lungimea medie asimptotică, LCC_0 reprezintă lungimea medie la eclozare, iar k este coeficientul de creștere, o măsură a ratei exponențiale cu care este atinsă lungimea asimptotică.

Analiza statistică s-a realizat cu ajutorul programului R (R Core Team 2023).

Activitatea 3. Colectarea datelor din teren. Am amplasat trei audio recordere automate AudioMoth v. 1.2 în interiorul zonei de studiu unde au fost observate țestoase cel mai frecvent de-a lungul timpului (**Figura 5**). Această zonă este inactivă din punct de vedere al săpăturilor arheologice, acoperită de vegetație stepică tipică dunelor de nisip, ferită de turiști. Cele trei recordere au fost setate să înregistreze peisajul acustic în intervalul de frecvență de 0-96 kHz la rezoluții de timp diferite, pentru a putea stabili rezoluția de eșantionare optimă pentru detectarea sunetelor de interes: continuu, 10 minute/oră, 1 minut/oră. Vom folosi acest design de colectare a datelor și în lunile septembrie 2023 și mai 2024, acestea fiind perioadele de activitate reproductivă maximă în această populație.

Concomitent, am realizat 5 vizite în teren pentru a colecta date privind împerecherea țestoaselor de-a lungul unui transect fix (vizual/auditiv) (**Figura 5**). Datele au fost colectate cu ajutorul unei fișe standard (coordonate geografice, metoda de detecție - vizual/auditiv, informații privind exemplarele observate - sex, dimensiuni, prezența marcajelor, fotografii ale carapacei pentru identificare).



Figura 5. Schița transectului fix și amplasarea audio-recorderelor pentru colectarea datelor din teren, în cadrul sitului arheologic Histria, jud. Constanța.

4. Rezultate preliminare

Inelele de creștere s-au format anual pe carapacea a 71% dintre indivizii recapturați analizați (57 țestoase cu vârste cuprinse între 3 și 26 ani). Eroarea de estimare a vârstei a variat între 1 și 10 ani la restul de 29% dintre indivizii analizați. Acuratețea metodei de estimare a vârstei pe baza inelelor de creștere de pe carapace este corelată negativ cu perioada de timp scursă între prima și ultima captură (regresie logistică: $\chi^2 = 17.123$, $P < 0.001$; $\beta = 1.528$, $SE = 0.121$, $P < 0.001$). Perioada de timp dintre prima și ultima captură a variat între 0,5 și 11 ani. Cele mai mari erori (i.e., 7, 8 și 10 ani) au fost observate la trei indivizi recapturați după 10, respectiv 11 ani.

În cazul estimării vârstei prin scheletocronologie, am observat că numărul de inele de creștere diferă între structurile osoase, în cadrul aceluiași individ (42% din cazuri). Am observat o acuratețe mai ridicată atunci când am utilizat ulna, radiusul și femurul, comparativ cu alte structuri osoase. Nu am putut utiliza vertebre, mandibule și falange, din cauza ratei avansate de resorbție în aceste oase. Timpul necesar decalcifierii a variat în funcție de dimensiunile structurilor osoase (testul Spearman: $\rho = 0.72$, $P < 0.001$; **Figura 6**), de la 10 minute la 14 zile.

Estimările de vârstă folosind cele două metode bazate pe inelele de creștere s-au corelat perfect în numai 28% din cazuri, fiind vorba de indivizi cu vârste până la 17 ani. În restul de 72% dintre cazuri, scheletocronologia a rezultat în estimări de vârstă mai reduse comparativ cu numărarea inelelor de creștere de pe carapace. Corelația dintre cele două metode scade cu vârsta ($F_{1,49} = 12.36$, $P < 0.000$, $r^2 = 0.72$) (**Figura 7**), cauzele posibile fiind resorbția și remodelarea țesutului osos, uzura carapacei, anumite boli, micoze. Vârsta maximă estimată pe baza inelelor de pe carapace a fost de 30 de ani, la doi indivizi unde numărul de inele din țesutul osos a indicat o vârstă mai redusă cu 6, respectiv 12 ani.

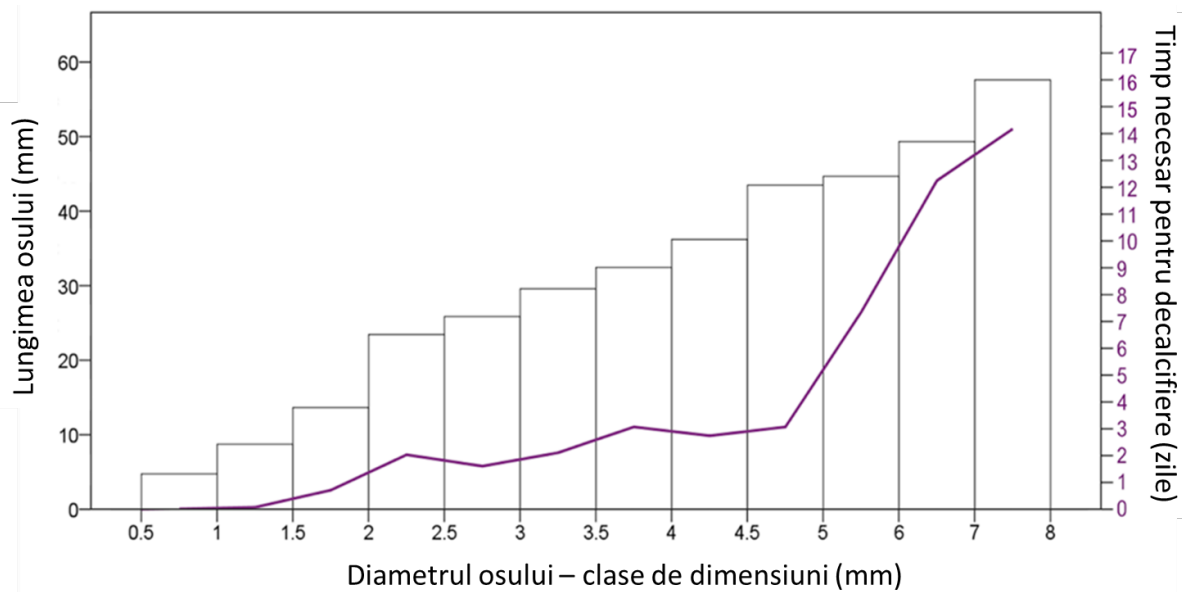


Figura 6. Timpii de decalcifiere necesari pentru prelucrarea structurilor osoase de diferite dimensiuni la țestoasa dobrogeană (*Testudo graeca*).

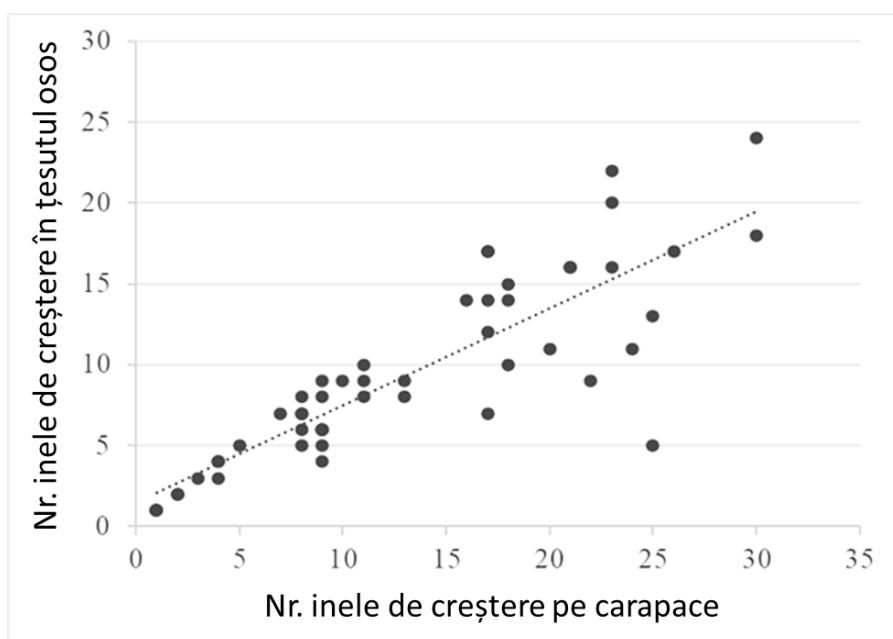


Figura 7. Corelația dintre numărul de inele de creștere formate pe carapace versus țesut osos la țestoasa dobrogeană (*Testudo graeca*).

Modelele de creștere obținute pe baza ambelor tipuri de estimări de vârstă au condus la rezultate similare (**Figura 8**).

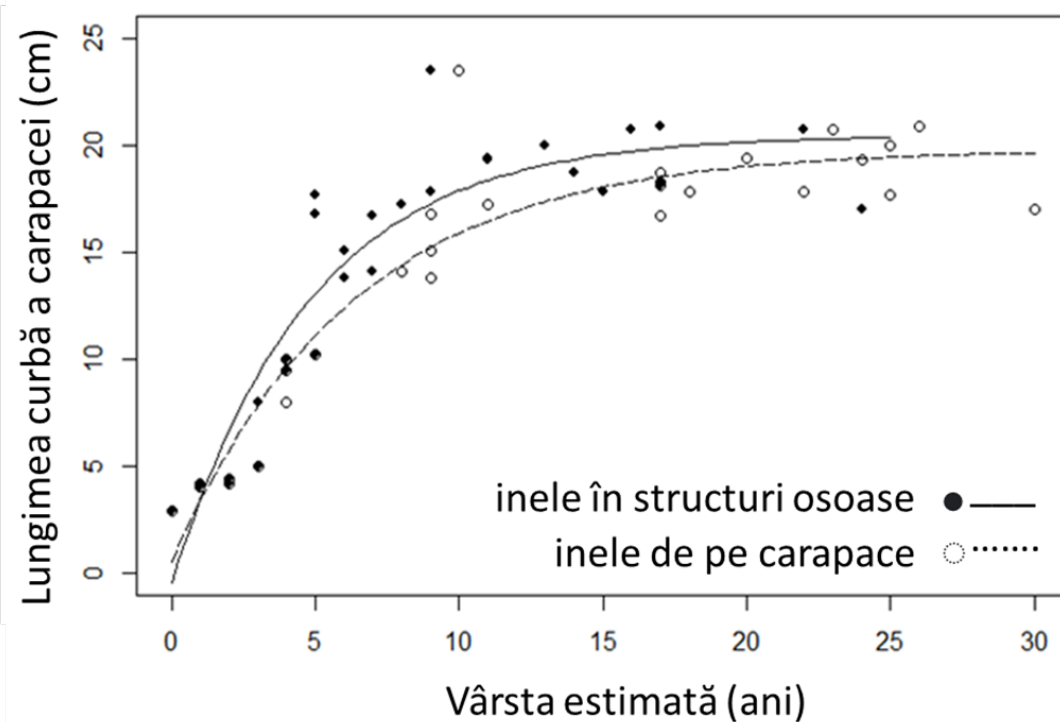


Figura 8. Comparația modelelor de creștere la țestoasa dobrogeană (*Testudo graeca*), folosind estimări ale vârstei individuale prin două metode.

În ceea ce privește monitorizarea acustică, rezultatele preliminare sugerează că detecția auditivă pe transect este momentan cea mai bună metodă de localizare a perechilor la reproducere. În zona de studiu, sunetele produse de ciocnirea carapacelor sunt adesea mascate de vânt, care produce zgomote cu intensitate mai mare și acoperă aceleași benzi de frecvență, ceea ce îngreunează detecția din înregistrările audio (**Figura 9**).

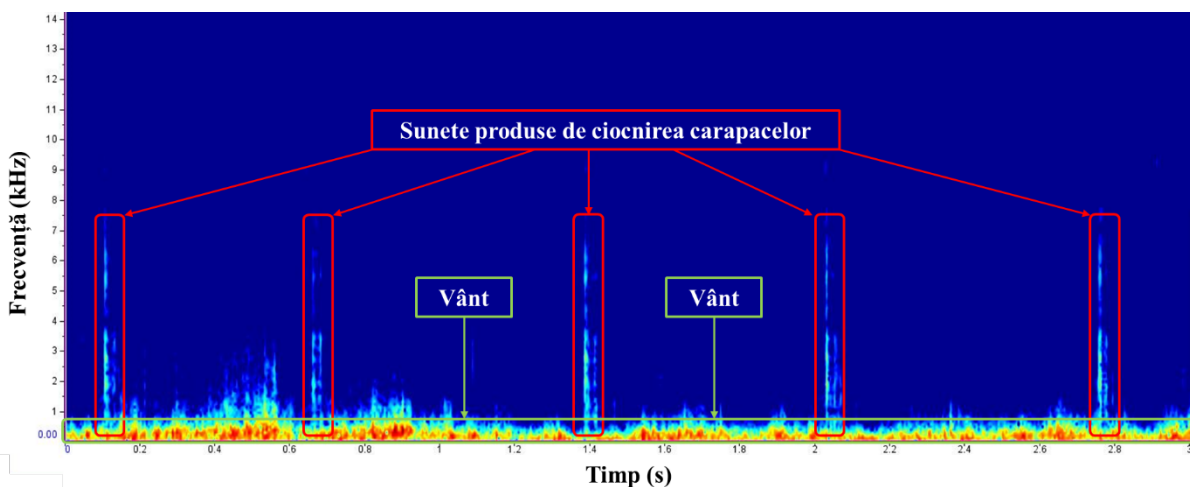


Figura 9. Detecția sunetelor produse de ciocnirea carapacelor în perioada de reproducere la țestoasa dobrogeană (*Testudo graeca*), cetatea Histria, jud. Constanța (Aprilie 2023).

Bibliografie

- Castanet, J., & Cheylan, M. (1979). Les marques de croissance des os et des écailles comme indicateur de l'âge chez *Testudo hermanni* et *Testudo graeca* (Reptilia, Chelonia, Testudinidae). *Canadian Journal of Zoology*, 57(8), 1649-1665.
- Castanet, J., & Smirina, E. (1990). Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. In *Annales des sciences naturelles. Zoologie et biologie animale*, 11(4), 191-196.
- Castanet, J. (1994). Age estimation and longevity in reptiles. *Gerontology*, 40(2-4), 174-192.
- R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Stănescu, F.**, Marangoni, F., Reinko, I., & Cogălniceanu, D. (2016). Life history traits of a Neotropical microhylid (*Dermatonotus muelleri*, Boettger 1885) from the Arid Chaco, Argentina. *The Herpetological Journal*, 26(1), 41-48.
- Vlad, S. E.**, Topliceanu, T. S., & Cogălniceanu, D. (2020). The impact of mowing management on a *Testudo graeca* population within a strictly protected area. *Herpetology Notes*, 13, 523-525.