Jacopo Crezzini, Alessandra Modi, David Caramelli

Analisi zooarcheologiche e paleogenetiche sugli avori di Montefortini

Riassunto – *L'identificazione del materiale biologico utilizzato per la produzione di manufatti è di fondamentale importanza per ricostruire i modelli di sfruttamento delle risorse animali adottati dalle popolazioni antiche nonché per tracciare le reti commerciali del passato. I frammenti di avorio recuperati nel tumulo etrusco di Montefortini rappresentano un ampio e prezioso campione sul quale è stato possibile testare nuovi protocolli di indagine non invasivi attraverso l'uso della videomicroscopia 3D. È stata così raccolta una significativa quantità di dati zooarcheologici che ha permesso di determinare la provenienza dell'avorio da proboscidati. Inoltre l'analisi dalle caratteristiche micromorfologiche e micromorfometriche ha messo in evidenza come il materiale utilizzato possa appartenere anche a taxa di proboscidati estinti migliaia di anni prima del periodo etrusco. Al fine di chiarire tali risultati sono state condotte analisi paleogenetiche su alcuni resti studiati dal punto di vista micromorfologico e micromorfometrico. A causa della scarsa preservazione del DNA endogeno, l'indagine molecolare non è stata tuttavia risolutiva per l'identificazione a livello di specie del materiale biologico utilizzato.*

1. La zooarcheologia e lo studio dei resti di avorio provenienti da contesti archeologici

La zooarcheologia è una disciplina che analizza i reperti faunistici recuperati in contesti archeologici. Le analisi condotte consentono di ottenere dati utili alla ricostruzione del comportamento dell'uomo nel passato. Il materiale esaminato è infatti ciò che rimane degli animali coinvolti nelle attività economiche, rituali e sociali delle comunità umane in epoche preistoriche e storiche.

Uno dei principali obiettivi della zooarcheologia è l'identificazione delle specie alle quali sono appartenuti i resti ritrovati. A questa si può giungere attraverso l'utilizzo di una collezione di confronto costituita da scheletri di animali attuali e di specie nota. La comparazione con le ossa comprese in questa collezione è volta a identificare sull'elemento fossile caratteristiche macromorfologiche diagnostiche utili alla sua determinazione tassonomica (ad esempio dimensioni e forma delle porzioni articolari, presenza e posizione di fori nutritizi e di rugosità per l'attacco di muscoli, legamenti o tendini). Tale procedura è valida sia per resti faunistici di epoca recente che per quelli legati a fasi più antiche della storia dell'uomo, in ragione del fatto che le morfologie scheletriche (siano esse ossa o denti/avorio) delle varie specie non hanno subìto significative variazioni nel corso dell'intero Quaternario (da 2,6 milioni anni fa ad oggi). L'avorio non fa eccezione.

Quando si parla di avorio si intende la dentina, una sostanza ossea di colore bianco-giallastro e di durezza notevole presente nei denti dei mammiferi. Grazie alla sua particolare composizione chimico fisica, per lo più costituita da fibre di collagene che forniscono elasticità e rinforzano la rigida matrice inorganica composta da idrossiapatite carbonata, l'avorio risulta essere un supporto ideale per l'intaglio e la scultura (Edwards *et al.*, 2006; Heckel, 2009); per questo è stato utilizzato per la produzione di manufatti fin dalle fasi più antiche della storia dell'uomo. Se è ben noto che tali attività sono avvenute sfruttando come materia prima principalmente la dentina dei proboscidati (di specie oggi estinte come il mammut nel Paleolitico e di elefanti attuali in periodi più recenti fino ad oggi), è bene tenere presente che, tra i mammiferi, anche i canini di ippopotamo, tricheco, cinghiale e facocero, gli incisivi di narvalo nonché i denti di capodoglio e orca hanno rappresentato, non di rado, fonti importanti di avorio. A questa lista vanno poi aggiunte altre sostanze naturali considerate 'sostituti' dell'avorio, sfruttate dall'uomo nella produzione di manufatti. Tra queste possiamo annoverarne sia di origine animale come ossa, conchiglie e tessuti ricavati da particolari parti anatomiche di alcune specie, come il casco del bucero dall'elmo (*Rhinoplax vigil*), sia di origine vegetale come il nocciolo della noce della palma di Tagua (*Phytelephas macrocarpa*) (Espinoza, Mann, 1991).

Con queste premesse è facile intendere come per i contesti archeologici che hanno restituito manufatti in avorio l'identificazione dell'origine di quest'ultimo sia di fondamentale importanza per ricostruire i modelli di sfruttamento delle risorse animali adottati. Purtroppo, questa informazione è molto spesso difficile da ottenere attraverso la sola comparazione fra le parti scheletriche comprese in una collezione di confronto e il manufatto in avorio ritrovato. Molto spesso, infatti, la realizzazione di quest'ultimo ha alterato

completamente le macromorfologie dell'elemento scheletrico di partenza rendendo inutile tale procedura comparativa. Non potendo quindi contare su questo tipo di esame è necessario analizzare da punti di vista differenti il manufatto onde individuare, se esistono e se sono state risparmiate dalla modificazione antropica e/o dai processi post-deposizionali, altre evidenze diagnostiche utili alla sua identificazione tassonomica.

2. L'identificazione tassonomica dei resti di avorio

Il riconoscimento dell'avorio di proboscidato può essere ottenuto anche ad occhio nudo, attraverso l'identificazione di una particolare struttura a scacchiera comunemente indicata come «struttura di Schreger». Questa è determinata alla presenza di microscopici canali che si irradiano all'interno della dentina, i microtubuli dentinali sinusoidali (Raubenheimer *et al.*, 1998), ed è particolarmente evidente nelle zanne. Quando tali tubuli sono intercettati da una superficie di taglio sulla sezione trasversale delle zanne, le sequenze di punti intercettati formano due diverse serie di linee che curvano in senso orario ed antiorario (Abelova, 2008).
La struttura di Schreger è una caratteristica apomorfa specifica del clade *Elephantoidea*, al quale appartengono gli attuali elefanti africani (*Loxodonta* spp.) e asiatici (*Elephas maximus*), insieme con i loro parenti estinti (es. i mammut, *Mammuthus* spp.). Tutti questi elefanti sono inclusi nell'ordine *Proboscidea*. Quindi, l'individuazione della struttura di Schreger permette di identificare l'avorio dei proboscidati, ma non consente di distinguere a quale specie, tra quelle appartenenti a quest'ordine, sia riferibile l'avorio esaminato.
Il primo a riconoscere nella struttura di Schreger elementi caratterizzanti l'avorio delle diverse specie di proboscidati fu T.K. Penniman (1952) tramite l'osservazione degli angoli formati dall'incrocio delle linee di Schreger. Rispetto all'orientamento della loro apertura egli definì «esterni» gli angoli con l'apertura rivolta verso le regioni distali (esterne) della zanna e «interni» quelli con l'apertura rivolta verso le regioni mediali (interne) della zanna. Successivamente Espinoza e Mann (1991; 1992) utilizzarono i diversi valori di questi angoli per distinguere l'avorio degli elefanti africani e asiatici attuali da quello dei *Proboscidea* estinti (mammut).
In tempi più recenti Trapani e Fisher (2003) hanno esaminato il valore diagnostico della struttura di Schreger considerando, oltre alle misure degli angoli esterni, altri due parametri: il generale aspetto della struttura (morfologia a X, V o C) e la «lunghezza d'onda» dei tubuli dentinali. In tal modo i due autori hanno cercato di caratterizzare l'avorio di mammut, quello dei mastodonti e quello degli elefanti moderni. Le analisi, eseguite su una sezione sottile della superficie trasversale delle zanne, hanno evidenziato come le caratteristiche della struttura di Schreger analizzate siano utili per discriminare i *taxa* dei proboscidati considerati. Tale discriminazione però è complicata dall'alta variabilità morfometrica e morfologica che questa struttura presenta in differenti zone della zanna di una stessa specie. Per questo motivo, se l'identificazione del *taxon* di appartenenza di zanne intere e isolate può essere relativamente facile, non si può dire lo stesso per i frammenti (lavorati e non) per i quali non è possibile conoscere la posizione della zanna dalla quale proviene il campione analizzato. In quest'ultimo caso Trapani e Fisher dimostrano che la valutazione di più caratteristiche della struttura di Schreger rilevabile in diversi punti di un singolo campione può aumentare le possibilità di riuscita. Inoltre, un'analisi multivariata dei dati raccolti, quando possibile, fornisce uno strumento molto efficace per discriminare avori di diverse specie di proboscidati anche senza conoscere la zona della zanna dalla quale proviene il campione esaminato.
Concludiamo questa breve descrizione dello stato dell'arte riguardante l'analisi di avori di origine ignota evidenziando come, negli ultimi decenni, alcuni studiosi abbiano utilizzato in tali ricerche anche metodi chemiometrici come, ad esempio, l'analisi degli elementi in traccia (Prozesky *et al.*, 1995; Shimoyama *et al.*, 1998) e la spettroscopia Raman non distruttiva (Edwards, Farwell, 1995; Edwards *et al.*, 1997a; 1997b; 1998; Shimoyama *et al.*, 1997).

3. Lo studio zooarcheologico degli avori di Montefortini

3.1 *Metodo di analisi*

Lo studio zooarcheologico condotto sui reperti di avorio di Montefortini ha riconsiderato il valore diagnostico della struttura di Schreger esaminandola attraverso l'utilizzo di un videomicroscopio digitale 3D. Con l'obiettivo di identificare a quale specie animale sia appartenuto l'avorio sfruttato dalle maestranze etrusche, sono state effettuate osservazioni micromorfologiche e micromorfometriche delle superfici dei frammenti ritrovati.
Le analisi sono state condotte con un videomicroscopio digitale Hirox KH-7700 dotato di un corpo MXG-10C, un obiettivo OL-140II e un adattatore per illuminazione direzionale AD-10S. Una delle più importanti funzioni di questo strumento (AMF 3D – Auto Multi Focus 3D Function) permette di ottenere immagini tridimensionali ad alta risoluzione delle superfici indagate, con la possibilità di osservare le stesse da più angolazioni, variando in tempo reale i valori dei tre assi. Sulla foto ottenuta si possono eseguire misurazioni angolari e lineari (queste ultime nell'ordine del

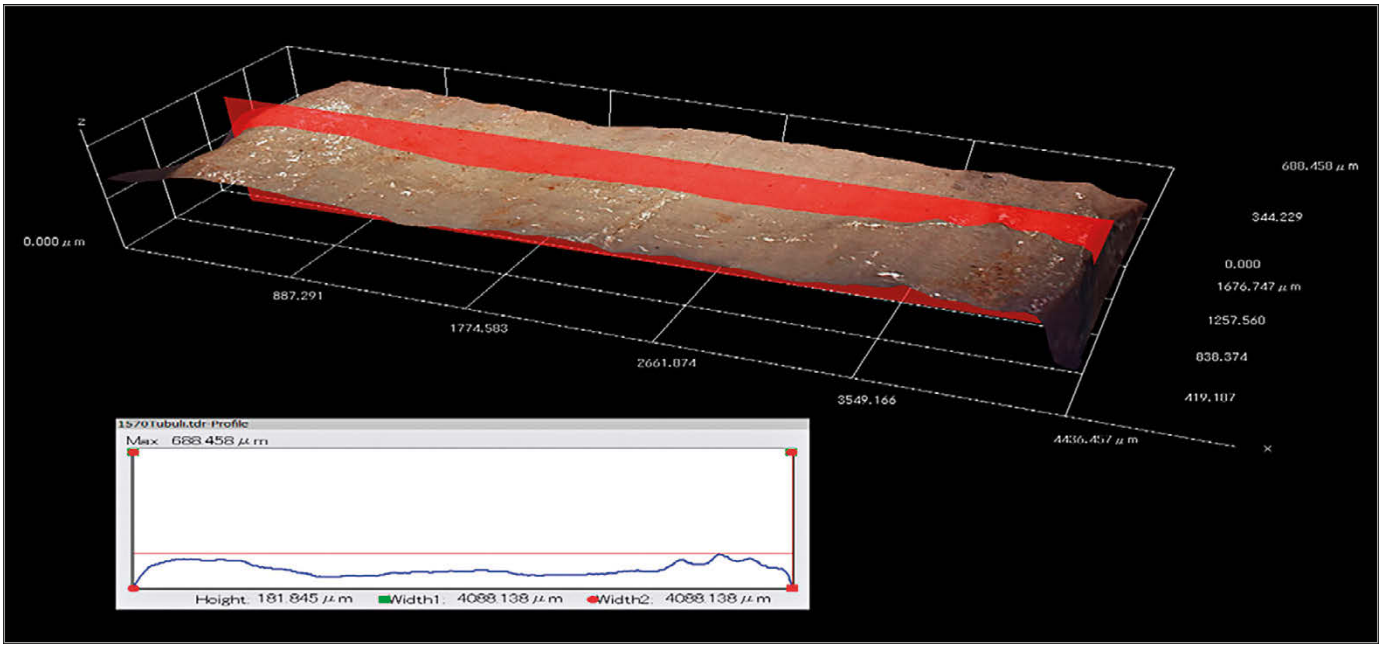

Fig. 1 – Valutazione dello sviluppo della microsuperficie della dentina su un'immagine 3D ad alta risoluzione.

micron), valutando in maniera oggettiva le micromorfologie identificate (Boschin, Crezzini, 2012; Moretti *et al.*, 2015). Questa procedura ha permesso di esaminare in dettaglio la struttura di Schreger nei frammenti di avorio di Montefortini e, ove possibile, di considerarne i parametri principali: i valori dell'angolo di intersezione delle linee di Schreger, l'aspetto qualitativo del loro pattern e la lunghezza d'onda dei tubuli dentinali (Trapani, Fisher, 2003). A differenza di altri protocolli utilizzati per questi scopi, lo studio effettuato in questo lavoro è caratterizzato da un'indagine non invasiva dei campioni. La scansione delle superfici d'avorio e la raccolta delle micromisure sono state eseguite in un tempo relativamente breve e senza alcuna preparazione o modifica dei campioni (mordenzatura, colorazione, preparazione di sezioni sottili, etc.; Abelova, 2008). Gli angoli di Schreger sono stati esaminati con ingrandimenti 50-100X, mentre per l'esame dei tubuli dentinali è stato necessario un ingrandimento di 140X (Crezzini *et al.*, 2022; 2023).

3.2 *Il campione analizzato*

Il materiale analizzato è rappresentato da 1752 frammenti di avorio (non più grandi di 5 cm). Su una buona quantità di questi resti, già ad occhio nudo, è stato possibile individuare le linee di Schreger. Nonostante ciò, molti campioni sono stati esclusi dall'analisi per la presenza sulle loro superfici di concrezioni o per la mancanza di sezioni trasversali piane. La presenza di irregolarità microscopiche, dovute ad esempio a concrezioni o alla rugosità della superficie, può infatti falsare la valutazione delle micromorfologie e delle micromorfometrie della struttura di Schreger.

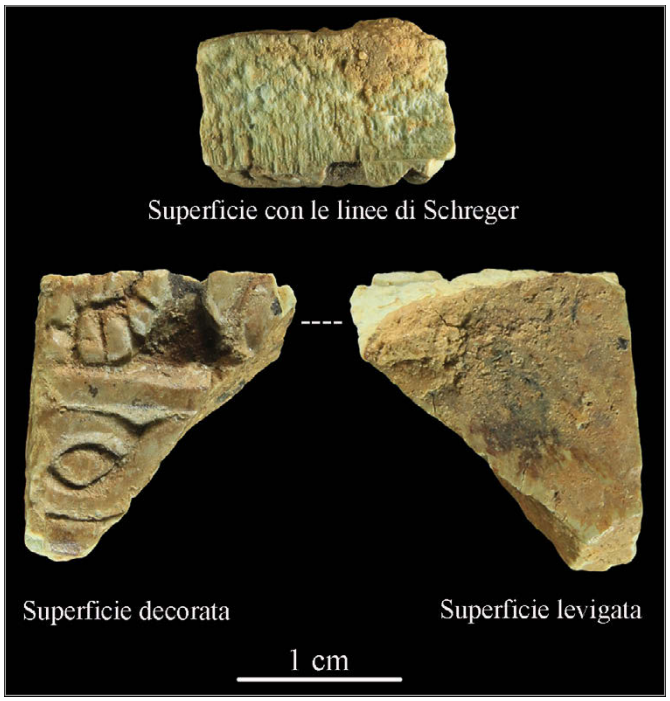

Fig. 2 – Un esempio dei frammenti di avorio considerati in questo studio (foto di Stefano Ricci).

L'esame di immagini 3D ad alta risoluzione effettuato in questo lavoro permette di valutare l'andamento della microsuperficie della dentina e le strutture di Schreger soltanto su superfici piane e non alterate da microfratture o microconcrezioni (*fig.* 1).
Oltre a ciò, sono state considerate solo le osservazioni condotte su frammenti nei quali era conservata almeno una

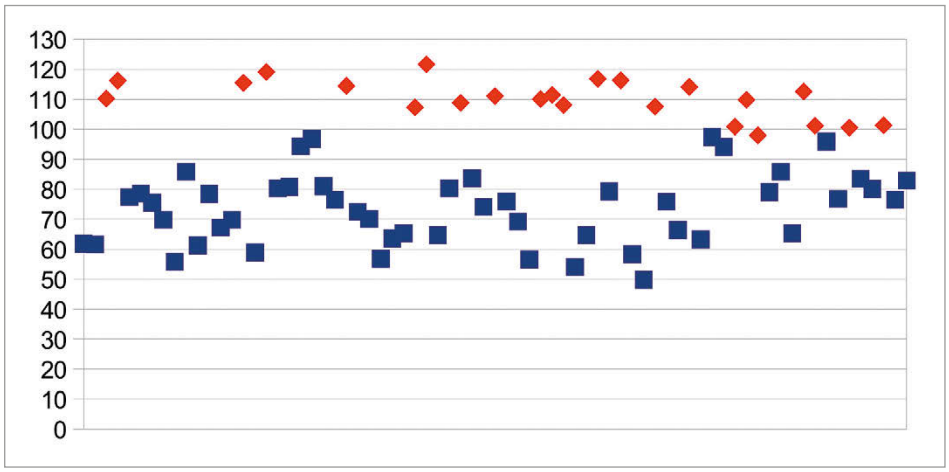

Fig. 3 – Valori degli angoli di Schreger misurati su 19 campioni di Montefortini (vedi anche *tab.* 1). Gli angoli con apertura rivolta verso le superfici levigate e decorate sono indicati dai quadratini blu.

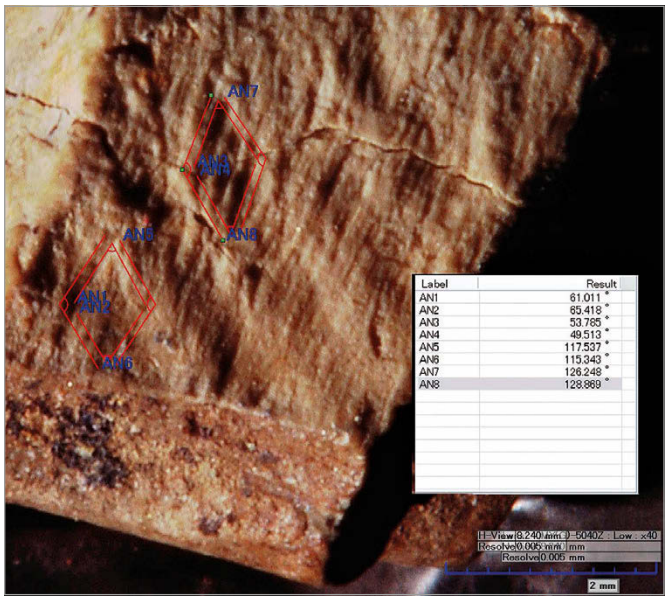

Fig. 4 – Valori degli angoli di Schreger misurati in prossimità della giunzione dentina-cemento in un reperto di Montefortini.

superficie intagliata e/o decorata, al fine di comprendere meglio l'orientamento del resto esaminato (*fig.* 2) (Crezzini *et al.*, 2022).
Con queste premesse si sono considerati i dati relativi alla struttura di Schreger raccolti su 35 reperti.

3.3 *Risultati*

La *fig.* 3 e la *tab.* 1 mostrano i valori degli angoli di Schreger misurati (n=19), corrispondenti a tutti e quattro gli angoli presenti in ogni forma romboidale identificata (*fig.* 4) (Crezzini *et al.*, 2023). È possibile osservare due *cluster* principali di dati: uno comprendente valori superiori a 90° e un altro caratterizzato da valori inferiori a 90° (*fig.* 3 e *tab.* 1). Si è notato che le aperture degli angoli acuti (insieme a cinque angoli con valore compreso tra 90°-100°) sono orientate verso le superfici scolpite e/o decorate. Considerando che queste ultime rappresentano probabilmente la superficie tangenziale della zanna sfruttata per la produzione del manufatto (Gyria, Khlopachev, 2018; Khlopachev, 2021) l'orientamento degli angoli acuti indica che essi potrebbero essere gli angoli di Schreger utili per differenziare le specie di proboscidati (gli angoli «esterni» e gli angoli «interni» *sensu* Penniman, 1952) (Palombo, Villa, 2001).
Questa ipotesi sembra essere confermata dall'analisi di due resti nei quali è stato individuato un sottile strato di cemento ancora conservato: tra gli angoli di Schreger misurati nelle sezioni trasversali di questi elementi, quelli acuti hanno l'apertura orientata verso tale tessuto (*fig.* 4). Nella zanna dei proboscidati quest'ultimo costituisce lo strato più esterno; la sua identificazione (o meglio l'identificazione della giunzione cemento-dentina o CDJ: Trapani, Fisher, 2003) consente quindi una migliore definizione dell'originale orientamento del frammento sulla zanna dalla quale è stato estratto, permettendo una valutazione più precisa dei valori morfometrici del modello di Schreger anche in funzione delle loro variazioni nelle diverse regioni del dente (Trapani, Fisher, 2003).
Nella *fig.* 5 sono riportate le lunghezze d'onda dei tubuli dentinali misurate nei campioni analizzati. I valori sono compresi tra 958,72 e 1,695 µm. Una porzione di cemento è stata rilevata su uno dei resti in cui la lunghezza d'onda dei tubuli adiacenti alla giunzione cemento-dentina risulta essere 1,154 µm (*fig.* 6).
Su tre elementi è stato possibile misurare contemporaneamente i valori degli angoli di Schreger e quelli della lunghezza d'onda dei tubuli; tali strutture sono state identificate su due superfici contigue dei reperti, che, quindi, rappresentano rispettivamente il profilo trasversale e il profilo radiale della zanna (*fig.* 5: a = lunghezza d'onda dei tubuli = 1,158,5 µm, angolo di Schreger = 69,2° a; b = lunghezza d'onda dei tubuli = 1,250,8 µm, angolo di Schreger = 64,7°; c = lunghezza dei tubuli = 1696,5 µm, angolo di Schreger = 65,4°). La combinazione di questi due dati

Campioni e Angoli	Angoli con apertura rivolta verso le superficie decorate/levigate	Angoli con apertura non rivolta le superficie decorate/levigate	Campioni e Angoli	Angoli con apertura rivolta verso le superficie decorate/levigate	Angoli con apertura non rivolta le superficie decorate/levigate	Campioni e Angoli	Angoli con apertura rivolta verso le superficie decorate/levigate	Angoli con apertura non rivolta le superficie decorate/levigate
Campione50AN1	61,79		Campione463AN1	80,3		Campione646AN5		97,93
Campione50AN2	61,59		Campione463AN2		108,81	Campione771aAN1	79,12	
Campione50AN3		110,24	Campione463AN3	83,61		Campione771aAN2	85,8	
Campione50AN4		116,2	Campione463AN4	74,14		Campione771aAN3	65,36	
Campione133AN1	77,37		Campione463AN5		111,08	Campione771aAN4		112,58
Campione133AN2	78,64		Campione463AN6	75,93		Campione771aAN5		101,11
Campione256AN1	75,56		Campione484AN1	69,29		Campione771bAN1	95,83	
Campione256AN2	69,85		Campione484AN2	56,56		Campione772AN1	76,82	
Campione256AN3	55,78		Campione484AN3		110,07	Campione772AN2		100,5
Campione256AN4	85,8		Campione484AN4		111,47	Campione772AN3	83,5	
Campione256AN5	61,23		Campione484AN5		108,07	Campione795AN1	80,07	
Campione256AN6	78,45		Campione505AN1	61,01		Campione795AN2		101,28
Campione340AN1	67,24		Campione505AN2	65,42		Campione795AN3	76,5	
Campione340AN2	69,85		Campione505AN3	53,78		Campione795AN4	82,92	
Campione340AN3		115,48	Campione505AN4	49,51		Campione1504AN1	62,2	
Campione340AN4	59		Campione505AN5		117,54	Campione1504AN2	64,78	
Campione340AN5		119,06	Campione505AN6		115,34	Campione1504AN3	62,58	
Campione340AN6	80,3		Campione505AN7		126,25	Campione1504AN4		119,94
Campione378AN1	80,89		Campione505AN8		128,87	Campione1513AN1	53,4	
Campione378AN2	94,42		Campione556AN1	79,27		Campione1513AN2	59,13	
Campione378AN3	96,84		Campione556AN2		116,3	Campione1513AN3	61,65	
Campione384AN1	81,05		Campione556AN3	58,4		Campione1562AN1	78,67	
Campione384AN2	76,6		Campione556AN4	49,8		Campione1562AN2	69,3	
Campione384AN3		114,47	Campione556AN5		107,54	Campione1562AN3	72,45	
Campione384AN4	72,5		Campione556AN6	75,8		Campione1562AN4		107,15
Campione455AN1	70,1		Campione556AN7	66,3		Campione1562AN5		113,11
Campione455AN2	56,8		Campione556AN8		114,07	Campione1562AN6		112,96
Campione455AN3	63,6		Campione556AN9	63,2		Campione1620AN1	61,56	
Campione455AN4	65,3		Campione646AN1	97,47		Campione1620AN2	60,25	
Campione455AN5		107,3	Campione646AN2	94,07		Campione1620AN3		124,77
Campione455AN6		121,6	Campione646AN3		100,81	Campione1620AN4		120,2
Campione455AN7	64,7		Campione646AN4		109,8	Campione1620AN5	67,26	

Tab. 1 – Valori degli angoli di Schreger registrati sui 19 campioni di Montefrotini considerati.

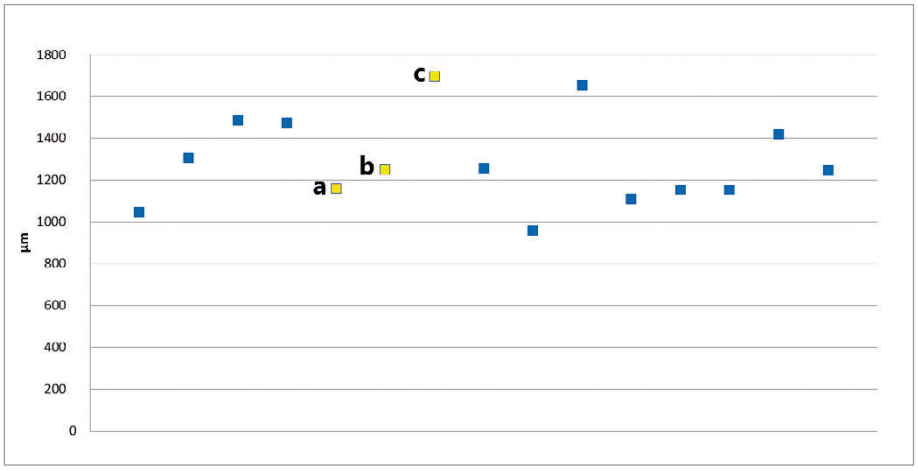

Fig. 5 – Valori delle lunghezza d'onda dei tubuli registrati nei resti di Montefortini considerati (i quadratini gialli indicano i reperti sui quali è stato possibile registrare anche i valori degli angoli di Schreger, vedi testo).

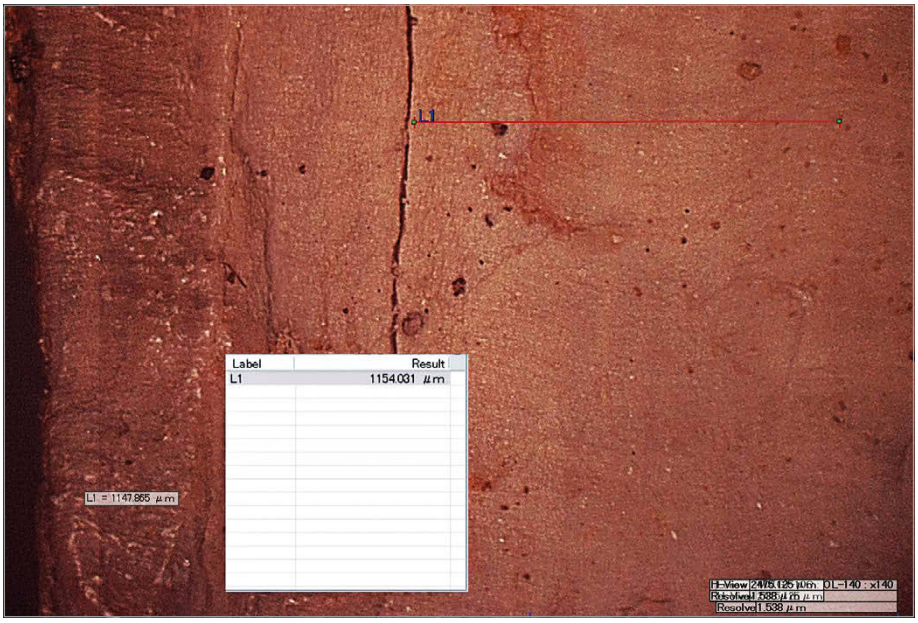

Fig. 6 – Valori della lunghezza d'onda dei tubuli dentinali in prossimità della giunzione dentina-cemento in un reperto di Montefortini.

Fig. 7 – Modello a "V" della struttura di Schreger rilevata sulla superficie di uno dei campioni analizzati.

morfometrici può fornire informazioni significative sia sulla posizione della zanna dalla quale provengono i resti, sia sul *taxon* sfruttato per il reperimento dell'avorio (Abelova, 2008; Trapani, Fisher, 2003).
Riguardo il generale aspetto della struttura di Schreger, in due esemplari si è registrata la presenza del modello a V (*sensu* Trapani, Fisher, 2003). I valori degli angoli misurati in queste strutture sono tutti inferiori ai 90° (*fig*. 7).
È importante sottolineare che i dati appena descritti sono stati raccolti in tempi relativamente brevi e senza trattamenti invasivi o distruttivi dei reperti.
Il confronto delle misure micromorfologiche e morfometriche ottenute con quelle relative alla dentina di diversi *taxa* di proboscidati disponibili in letteratura fa emergere un dato interessante, che qui discutiamo pur in attesa di necessari approfondimenti.
Espinoza e Mann (1992) hanno dimostrato che il valore medio dell'angolo di Schreger è superiore a 100° negli elefanti attuali, mentre nei proboscidati estinti tale valore medio risulta essere inferiore a 100°. In particolare, l'ampiezza media dell'angolo di Schreger nel mammut è 73,21±14,71 mentre nell'elefante africano è pari a 124,15±13,35. Analogamente, i valori degli angoli esterni di Schreger sono inferiori a 85° per *Anancus arvernensis* e a 90° per *Mammuthus lamarmorai* (Palombo, Villa, 2001; Palombo *et al.*, 2012).
Espinoza e Mann (1991) specificano anche che, poiché nelle zone più prossime al cemento gli angoli esterni di Schreger possono presentare valori compresi tra 90° e 115° sia nei proboscidati estinti sia in quelli attuali, la differenziazione del mammut da *Loxodonta africana* ed *Elephas maximum* (ovvero, rispettivamente, elefante africano ed elefante asiatico) non dovrebbe mai basarsi su singole misurazioni angolari che rientrano in questo intervallo. Nello stesso intervallo di valori ricade anche la variabilità delle ampiezze degli angoli esterni di Schrenger rilevabili nelle zanne di *Palaeoloxodon antiquus* ed *Elephas falconeri* (Palombo, Villa, 2001). Gli angoli di Schreger misurati nei frammenti di avorio di Montefortini sono comunque rappresentati principalmente da angoli acuti.
Riguardo la lunghezza d'onda dei tubuli dentinali nei nostri campioni essa è compresa tra 958,72 e 1,695 μm (*fig*. 5). I mammut hanno tipicamente lunghezze d'onda di 1 mm o superiori (Trapani, Fisher, 2003). Ma se la lunghezza d'onda dei tubuli non è un buon *proxy* per discernere i *taxa* di proboscidati, la valutazione di più parametri della struttura di Schreger (e più in generale della dentina) in più punti di un singolo frammento incrementa le possibilità di un'attribuzione specifica dell'avorio, anche e soprattutto nei casi in cui la posizione sulla zanna dalla quale proviene il reperto esaminato risulti sconosciuta (Trapani, Fisher, 2003). Nel mammut la lunghezza d'onda dei tubuli dentinali aumenta notevolmente spostandosi verso l'asse centrale della zanna. Nella stessa direzione l'ampiezza degli angoli di Schreger decresce (Abelova, 2008; Trapani, Fisher, 2003). Ai valori massimi delle lunghezze d'onda dei tubuli (circa 2,175 μm) corrispondono i valori minimi degli angoli di Schreger (vicino alla cavità della polpa dentaria). Al contrario, la lunghezza d'onda dei tubuli diminuisce spostandosi verso la superficie esterna della zanna (fino a circa 1,100 μm) dove si registrano gli angoli di Schreger più ampi (Abelova, 2008). Su ciascuno dei tre reperti di Montefortini nei quali è stato possibile misurare sia le lunghezze d'onda dei tubuli sia le ampiezze degli angoli, la relazione tra queste due caratteristiche della struttura di Schreger è compatibile con i dati appena descritti suggerendo la possibilità che questi campioni rappresentino frammenti di una zanna di mammut provenienti da una zona del dente situata a circa 1-2 cm dalla superficie esterna (Abelova, 2008). In aggiunta a ciò, il valore della lunghezza d'onda dei tubuli misurato su un reperto in cui si è conservata una piccola porzione di cemento è analogo (1,154 μm) a quello misurato da Abelova (2008) in microtubuli situati in prossimità della superficie esterna di una zanna di mammut.
Per quanto riguarda la valutazione del disegno generale descritto dalla struttura di Schreger, il genere *Elephas* è caratterizzato dall'assenza, in ogni parte della zanna, del cosiddetto motivo a V, presente al contrario in prossimità dell'asse centrale della zanna di *Mammuthus* (Trapani, Fisher, 2003; Palombo *et al.*, 2012). Il generale aspetto della struttura descritta dalle linee di Schreger (morfologia a X, V o C) è legato anche alle ampiezze degli angoli formati dalle loro intersezioni. Nelle zanne di *Mammuthus*, il motivo a V è individuabile in prossimità della cavità pulpare, dove gli angoli di Schreger esterni hanno ampiezze ridotte comprese tra i 25 ed i 90 gradi (Abelova, 2008). Tra i resti di Montefortini tale motivo geometrico è stato osservato su due reperti e i valori degli angoli di Schreger ad esso associati sono compresi tra i 68 ed i 75 gradi (*fig*. 7).
I dati micromorfologici e micromorfometrici relativi alle strutture di Schreger individuate sui resti di Montefortini sembrano quindi essere compatibili con quelli caratteristici della dentina di mammut (*M. primigenius*, *M. meridionalis*, *M. trogontheri*, *M. lamarmorai*) e di *Anancus arvernensis* (Abelova, 2008; Penniman, 1952; Palombo, Villa, 2001; Espinoza, Mann, 1991; 1992; Trapani, Fisher, 2003) (*figg*. 3-7 e *tab.* 1).
Ciò rappresenta un risultato 'inaspettato' considerando che, al tempo degli etruschi, tali specie di proboscidati risultano estinte da almeno 10.000 anni e necessita di una discussione approfondita che tenga in considerazione due imprescindibili aspetti che possono aver influenzato la scelta della materia prima da parte delle maestranze etrusche:
– la disponibilità che gli Etruschi avevano di avorio appartenente a diverse specie di Proboscidati e la facilità/difficoltà con cui esso poteva essere reperito;
– le caratteristiche fisiche che rendono questa sostanza un supporto ideale per l'intaglio e la scultura.

3.4 *Discussione dei dati zooarcheologici*

I resti di diverse specie di proboscidati estinti sono ampiamente documentati nei depositi pleistocenici italiani (Palombo, Ferretti, 2005) ed europei. Tra questi, sono compresi *taxa* caratterizzati da dati micromorfologici e micromorfometrici delle strutture di Schreger compatibili con quelli registrati nei campioni di Montefortini (ad esempio *Mammuthus primigenius*, *Anancus arvensis*, *Mammuthus lamarmorai*). Resti di *Elephas* (*Palaeoloxodon*) *antiquus* e *Mammuthus primigenius* sono attestati in Italia dalla provincia settentrionale di Ferrara (Gallini, Sala, 2001) fino alla Puglia (Rustioni *et al.*, 2003), compresa la Toscana (Palombo, Ferretti, 2005), e lungo la costa mediterranea dalla città di Marsiglia fino alla Liguria (Moussous *et al.*, 2014; Onoratini *et al.*, 2012). Inoltre, popolazioni di mammut 'nano' (*Mammuthus lamarmorai*) sono attestate nel Pleistocene della Sicilia e della Sardegna (Palombo *et al.*, 2012). Gli Etruschi ebbero probabilmente la possibilità di reperire l'avorio fossilizzato di diverse specie di proboscidati del Pleistocene italiano intercettando tali depositi nel corso delle loro numerose attività estrattive, edilizie e agricole. Oltre a ciò, non è da escludere che tali resti possano essere stati facilmente recuperati una volta esposti dai processi geologici naturali come la deposizione alluvionale e l'erosione dei letti dei fiumi.
Nonostante queste ipotesi, non crediamo che per il popolo etrusco tale avorio 'fossilizzato' potesse rappresentare una materia prima utile per produrre manufatti. Il processo di fossilizzazione può alterare questo materiale privandolo di quelle caratteristiche che lo rendono un supporto ideale per l'intaglio e la scultura. Ci riferiamo soprattutto alla sua composizione, costituita per lo più da fibre di collagene che conferiscono elasticità e rinforzano la rigida matrice inorganica composta da idrossiapatite carbonata. A conferma di ciò, non abbiamo trovato alcuna documentazione relativa a resti di avorio riferibili a *Palaeoloxodon antiquus*, *Anancus arvensis*, *Mammuthus primigenius* e al "mammut nano" (*Mammuthus lamarmorai*) provenienti da depositi pleistocenici italiani ed europei sfruttati nella produzione di manufatti (artigianato storico e contemporaneo, attività sperimentali).
Al contrario, l'avorio di mammut conservato nel permafrost di numerosi giacimenti dell'Europa nord-orientale potrebbe non aver subìto le alterazioni causate dalla fossilizzazione grazie alle condizioni altamente conservative legate alla sua peculiare deposizione. Ancora oggi, è ben diffuso l'utilizzo dell'avorio di mammut recuperato dal permafrost sia per la realizzazione di attività sperimentali sia in attività artigianali e commerciali (talvolta l'uso di questo avorio è addirittura incoraggiato dalle amministrazioni politiche per contrastare il mercato illegale di avorio di *Elephas maximum* e *Loxodonta africana*). Gli artigiani che lavorano questo materiale testimoniano come, una volta estratte le zanne dal permafrost, le caratteristiche fisiche di queste (quindi la loro elasticità e la loro lavorabilità) risultano del tutto analoghe a quelle delle zanne 'fresche' degli elefanti attuali (Gyria, Khlopachev, 2018). Ciononostante, sebbene nei contesti etruschi sia attestata la presenza di materie prime e di oggetti provenienti dall'Europa nord-orientale (Massini, Arancio, 2012) – l'ambra è stata rinvenuta anche nel tumulo di Montefortini e in quello vicino dei Boschetti (Bettini *et al.*, 2011) – è necessario tener presente anche il più 'agevole' accesso all'avorio di *Elephas maximum* e/o *Loxodonta africana* che il popolo etrusco poteva aver avuto in virtù degli intensi scambi commerciali con le coeve popolazioni asiatiche e africane (Posth *et al.*, 2021; Colonna, 2000).
Nell'avanzare una nuova ipotesi riguardo l'origine dell'avorio sfruttato a Montefortini appare doveroso quindi considerare almeno due *bias* che possono aver interessato il nostro studio e quindi influenzato le nostre interpretazioni:

1) le possibili distorsioni nella valutazione delle caratteristiche micromorfologiche e micromorfometriche della struttura di Schreger. Le osservazioni morfometriche e morfologiche sulle superfici dei frammenti di avorio tal quali e non su delle loro, più uniformi, sezioni sottili, potrebbe aver causato, ad esempio, la distorsione dei valori degli angoli misurati. Per verificare che le nostre analisi non siano state affette da questo tipo di errore si è proceduto in seguito all'estrazione di una sezione sottile (spessore 150 μm) dalla superficie di uno dei frammenti considerati in questo studio (ID 378). Le misure degli angoli di Schreger rilevate su questa sezione sottile mediante la loro osservazione al microscopio ottico polarizzatore in luce riflessa (microscopio DMRXP corredato di telecamera della Leica Microsystems) risultano compatibili con quelle registrate analizzando il campione tal quale in microscopia 3D (*fig.* 8 e *tab.* 1);

2) se il precedente test può confortare sulla veridicità dei valori angolari misurati nel corso del nostro protocollo di indagine 3D non invasivo, una definitiva interpretazione di questi dati non è comunque scevra dai limiti causati dall'impossibilità di conoscere l'orientamento e le posizioni che avevano originariamente i frammenti esaminati sulle zanne. Dobbiamo considerare infatti la possibile analogia tra le caratteristiche micromorfologiche e micromorfometriche della struttura di Schreger che può essere presente in alcune zone delle zanne degli elefanti attuali e dei proboscidati estinti.
Al riguardo Singh *et al.* (2006) hanno analizzato i valori degli angoli di Schreger su numerosi campioni di avorio di proboscidati estinti prelevati da tre diverse zone della zanna (centrale, mediale ed esterna), dimostrando che i valori medi degli angoli presenti nelle porzioni centrale e mediale della zanna di *Loxodonta africana* e *Elephas maximum* sono sovrapponibili, con valori compresi tra 65 e 90 gradi. Il confronto di questi dati con i valori degli angoli di Schreger misurati nel campione di Montefortini può suggerire trattarsi

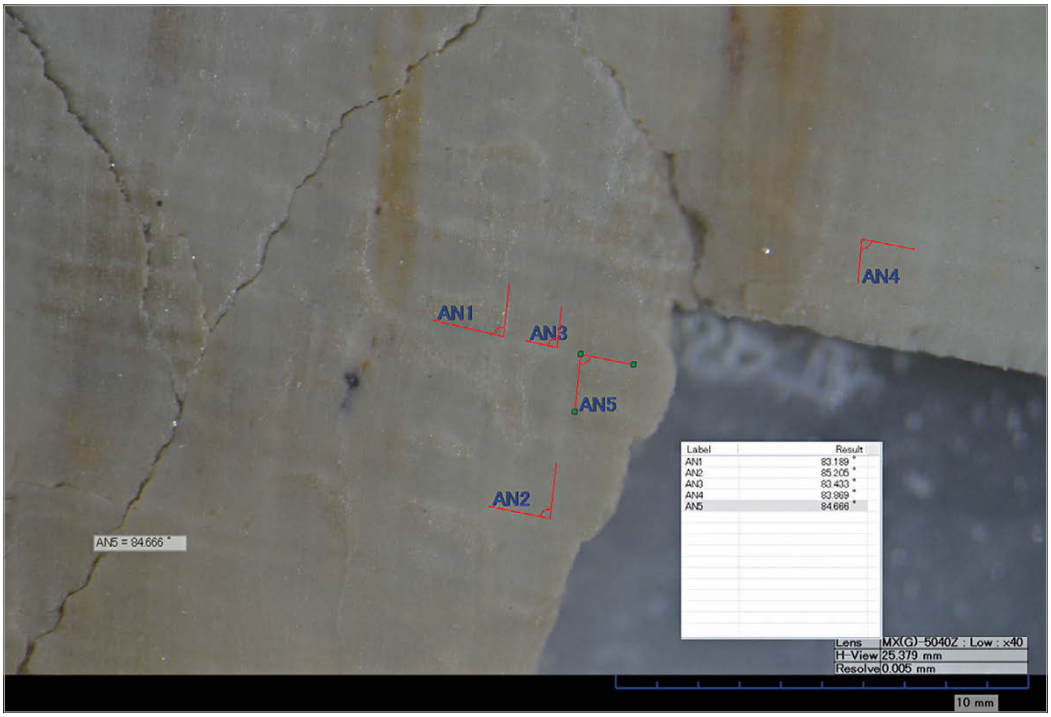

Fig. 8 – Misure degli angoli di Schreger rilevate sulla sezione sottile del campione 378 (spessore 150 µm) mediante osservazione al microscopio ottico polarizzatore in luce riflessa (microscopio DMRXP corredato di telecamera della Leica Microsystems).

di avorio di elefanti africani o asiatici proveniente dalla parte centrale e/o interna delle zanne. Ciò comunque contrasta con i valori acuti degli angoli registrati in prossimità degli strati di cemento conservati in due dei nostri campioni.

In conclusione, la validazione del metodo d'indagine zooarcheologica proposto in questa sede come protocollo non invasivo utile per la discriminazione di *taxa* di Proboscidati in campioni archeologici necessita di:
– un allargamento delle indagini su un campione più ampio di reperti;
– la realizzazione di ulteriori analisi che possano esaminare caratteristiche diverse del campione esaminato, come ad esempio esami paleogenetici, caratterizzazioni chimiche della dentina, datazioni radiometriche.

4. Le analisi paleogenetiche

Con l'intento di confermare l'identificazione tassonomica suggerita dalle analisi zooarcheologiche abbiamo sottoposto ad analisi paleogenetiche sette frammenti per i quali l'analisi micromorfometrica e micromorfologica suggeriva l'attribuzione a *Mammuthus sp*. (*tab.* 2). L'esame morfologico dei resti zooarcheologici è certamente un metodo economico e non invasivo per identificare i reperti quando sono presenti caratteristiche diagnostiche sufficienti e si dispone di materiale di riferimento comparativo adeguato. Quando queste condizioni non possono essere soddisfatte o c'è la necessità di validare un metodo diagnostico – come quello proposto in questa sede – l'analisi del DNA antico (aDNA, *ancient DNA*), in particolare di specifici marcatori molecolari, risulta l'applicazione più efficace.
Il recente sviluppo nelle tecnologie di sequenziamento, unitamente alla messa a punto di protocolli ottimizzati per l'estrazione del DNA (Dabney *et al.*, 2013; Harney *et al.*, 2021) consentono di recuperare materiale genetico informativo da numerosi substrati biologici in aggiunta ai più tradizionali ossa e denti (Lech, 2016; Epp *et al.*, 2019; Wales, Kistler, 2019; Hagan *et al.*, 2020; Modi *et al.*, 2020; 2021). Al giorno d'oggi, le ricerche paleogenetiche coinvolgono reperti storici e preistorici provenienti da scavi archeologici, biblioteche e collezioni museali, e hanno reso il DNA antico uno strumento di fondamentale importanza per la contestualizzazione e valorizzazione del patrimonio culturale. L'unica limitazione è rappresentata dalla diagenesi del DNA nell'ambiente di deposizione del reperto. Infatti, una volta che l'organismo muore il DNA va incontro ad una serie di danni autolitici e diagenetici che portano ad alterazioni biochimiche, frammentazione e contaminazione con materiale genetico esogeno (Höss *et al.*, 1996; Briggs *et al.*, 2007). Tutte queste alterazioni post-mortem sono certamente proporzionali al tempo – più antico è il reperto maggiore è il danno che il DNA subisce (Sawyer *et al.*, 2012) – ma la cinetica della degradazione è fortemente influenzata anche dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente di deposizione (Orlando *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2018).
Abbiamo applicato metodologie di analisi molecolare di nuova generazione basate su NGS (*Next Generation Sequencing*)

ID Archeologico	Lab ID	Quantità usata per l'estrazione (mg)	Protocollo di estrazione del DNA
1744 (252855)	AE-1744	368	Harney et al. 2021
1570	AE-1570	145	Harney et al. 2021
794	AE-794	222	Harney et al. 2021
378	AE-378	143	Dabney et al. 2012
Mont EF Cas 17 ind. 505 JC	AE-505	185	Harney et al. 2021
256	AE-256	78	Dabney et al. 2012
1503	AE-1503	44	Dabney et al. 2012

Tab. 2 – Frammenti utilizzati per le analisi molecolari. Vengono riportati anche il peso del materiale e il protocollo utilizzato per l'estrazione del DNA antico.

al fine di recuperare porzioni genetiche informative per l'identificazione della specie di proboscidato da cui proviene l'avorio dei manufatti di Montefortini. In particolare, ci siamo concentrati sull'analisi del DNA mitocondriale (mtDNA, *mitochondrial DNA*), il marcatore molecolare maggiormente utilizzato per l'identificazione tassonomica anche in ambito forense (Meiklejohn *et al*., 2021; Mori, Matsumura, 2021). Le sue caratteristiche lo rendono infatti particolarmente efficace quando si lavora con materiale antico e degradato: si tratta di un genoma circolare piuttosto corto (nei mammiferi è lungo solitamente intorno alle 16 chilobasi) ed è presente in un elevato numero di copie per cellula. Inoltre, contiene alcune regioni, come i geni della citocromo b (cyt b) e della citocromo c ossidasi I (COI), i geni 12S e 16S dell'RNA ribosomiale e la D-loop nella regione di controllo, che presentano un'elevata variabilità interspecifica e che pertanto sono diagnostiche per la distinzione delle diverse specie di mammiferi (Cardinali *et al*., 2023).

Le analisi sono state svolte nei laboratori di Antropologia molecolare e Paleogenetica del Dipartimento di Biologia dell'Università di Firenze applicando protocolli specificamente sviluppati per il recupero dell'aDNA, attenendosi rigorosamente alle regole per la prevenzione delle contaminazioni. Nelle fasi di estrazione ed allestimento della libreria è stato inserito un controllo negativo (ovvero un campione in cui sono presenti solo i reagenti, senza l'aggiunta di materiale biologico), così da monitorare l'eventuale presenza di contaminazioni nei reagenti utilizzati. Abbiamo inoltre adottato metodologie di campionamento minimamente invasive al fine di preservare il più possibile l'integrità dei reperti. I frammenti sono stati prima di tutto puliti esternamente con una soluzione di NaClO al 2% (a cui fa seguito un lavaggio con etanolo al 95%) e quindi sottoposti a raggi UV a 254 nm per 10 minuti su ciascun lato così da rimuovere il DNA esogeno sia di natura batterica che derivante dalla manipolazione dei campioni durante le analisi micromorfologiche e micromorfometriche. In base alla fragilità del frammento, abbiamo scelto di procedere con l'estrazione del DNA non distruttiva (Harney *et al*., 2021) (campioni: AE-1744, AE_1570, AE-794 e AE-505) oppure di recuperare una piccola quantità di polvere (compresa tra i 45 e i 150 mg) dalla porzione più interna, utilizzando un microtrapano a bassa velocità di rotazione con microfrese rotanti usa e getta dalla quale poi il DNA è stato estratto secondo il protocollo descritto da Dabney *et al*. (2012) (campioni: AE-256, AE-1503 e AE-378) (*tab.* 2). Venti microlitri di estratto sono poi stati utilizzati per la preparazione delle librerie Illumina dual-index secondo un protocollo modificato specifico per il DNA antico (Meyer, Kircher, 2010). In fase di preparazione delle librerie non è stato effettuato trattamento con UDG (Uracil DNA glicosilasi) al fine di mantenere i danni post-mortem delle molecole utili per l'autenticazione dei risultati finali. Dopo purificazione con kit MinElute (Qiagen) le librerie ottenute sono state valutate qualitativamente e quantitativamente mediante Agilent TapeStation (kit D1000). Le librerie sono state prima sottoposte ad un sequenziamento diretto (sequenziamento *shotgun*) esplorativo per valutare lo stato di preservazione del DNA di ciascun campione sfruttando la piattaforma Illumina NovaSeq 6000 (2x50+8+8 cicli). Successivamente, per i campioni meglio preservati è stata adottata una strategia di *target enrichment* mirata a recuperare l'intero genoma mitocondriale, utilizzando come pannello di sonde il myBaits® Expert Mito disegnato sull'mtDNA di mammut lanoso (NCBI accession: KX027526). Abbiamo seguito il protocollo *High Sensitivity* – che meglio si adatta alle caratteristiche del DNA antico (presenza di contaminanti e frammentazione) – seguendo le indicazioni dall'azienda produttrice delle sonde. Esso prevede due round consecutivi di cattura dove la temperatura di ibridazione sonde-DNA *target* è stata impostata a 63°C nel primo round di cattura e a 60°C nel secondo. Alla fine, il materiale genetico recuperato è stato sottoposto a 14 cicli di PCR utilizzando il kit Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies), quantificato con Agilent TapeStation (kit D1000 High Sensitivity) e sequenziato su piattaforma Illumina MiSeq con 2x75+8+8 cicli.

Le *reads* grezze sono state analizzate sfruttando il *software* EAGER (Peltzer *et al*., 2016), applicando una pipeline bioinformatica specifica per il DNA antico. Dopo il controllo qualitativo iniziale, la rimozione degli adattatori e il *merging* delle *reads*, le sequenze più lunghe di 30 paia di basi (bp) ottenute dal sequenziamento *shotgun* sono state mappate sul genoma di riferimento dell'elefante africano (LoxAfr 3.0) mediante BWA 0.7.17 (Li, Durbin, 2009) impostando i parametri indicati per il DNA antico (-l 16500 -n 0,01 -o 2) (Schubert *et al*., 2012). Le *reads* ottenute con il *target enrichment* sono state allineate sulla sequenza di riferimento mitocondriale dell'elefante africano (NC_000934) ed asiatico (NC_005129) e sul genoma mitocondriale di mammut lanoso (KX027526) utilizzando *CircularMapper* (Peltzer *et al*., 2016), un *tool* di mappaggio iterativo presente in EAGER

Lab ID	#Raw reads	#Merged reads	#Mapped reads prior DeDup	#Duplicates removed	%Mapped reads after DeDup	%Endogenous DNA	Cluster factor	%C>T	%G>A	Average fragment length (bp)
AE-1503	36303668	11922427	5455	140	718	0,046	1,195	3,25	0,94	33,72
AE-1570	34432436	12339816	9940	245	581	0,081	1,442	4,57	0	35,87
AE-1744	25614278	6630759	19592	557	505	0,295	2,103	4,52	1,25	40,15
AE-256	52576440	18767165	7474	219	931	0,040	1,235	4,56	2,83	33,23
AE-378	64324176	23334823	7508	289	1820	0,032	1,159	17,42	18,01	32,96
AE-794	36361676	12895051	13487	294	519	0,105	1,566	4,14	0,97	37,93

Tab. 3 – Risultati delle analisi bioinformatiche ottenuti dal mappaggio sul genoma di *Loxodonta africana* (LoxAfr 3.0).

Lab ID	#Raw reads	#Merged reads	#Mapped reads prior DeDup	#Duplicates removed	%Mapped reads after DeDup	Cluster factor	%C>T	%G>A	Average fragment length (bp)
AE-378	7093800	2854679	244416	244382	34	7188,706	9,09	40	35,76
AE-378.2	7411548	3011004	47847	47835	12	3987,250	10,03	100	39,83

Tab. 4 – Risultati delle analisi bioinformatiche ottenuti dal mappaggio sul genoma di riferimento mitocondriale di *Loxodonta africana* (NC_000934).

Lab ID	#Raw reads	#Merged reads	#Mapped reads prior DeDup	#Duplicates removed	%Mapped reads after DeDup	Cluster factor	%C>T	%G>A	Average fragment length (bp)
AE-378	7093800	2854679	242259	242237	22	11011,8	14,29	100	36,5
AE-378.2	7411548	3011004	10761	10751	10	1076,10	100	25	38,2

Tab. 5 – Risultati delle analisi bioinformatiche ottenuti dal mappaggio sul genoma di mitocondriale di *Mammuthus primigenius* (KX027526).

Lab ID	#Raw reads	#Merged reads	#Mapped reads prior DeDup	#Duplicates removed	%Mapped reads after DeDup	Cluster factor	%C>T	%G>A	Average fragment length (bp)
AE-378	7093800	2854679	243939	243913	26	9382,269	11,11	33,3	36,5
AE-378.2	7411548	3011004	46116	46108	8	5764,500	N/A	N/A	36,63

Tab. 6 – Risultati delle analisi bioinformatiche ottenuti dal mappaggio sul genoma di mitocondriale di *Mammuthus primigenius* (KX027526).

appositamente progettato per i genomi circolari, impostando i parametri di BWA sopra indicati. Infine, le sequenze mappanti sui tre genomi mitocondriali sono state analizzate con BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990), un *software* che utilizza un approccio euristico per fornire il miglior allineamento locale possibile.

Il sequenziamento *shotgun* ha evidenziato una scarsa preservazione del materiale genetico, infatti, la percentuale di DNA attribuita a *Loxodonta africana* è risultata estremamente bassa per tutti i reperti analizzati, compresa tra 0,295% del campione AE-1744 e 0,032% del campione AE-378 (*tab.* 3). Inoltre, i frammenti ottenuti non mostrano i pattern di deaminazione tipici delle molecole antiche. Nel tempo, infatti, la citosina si deamina in uracile, che viene codificato come residuo di timina (Hofreiter *et al.*, 2001), soprattutto alle estremità dei frammenti. I modelli di misincorporazione da C a T all'estremità 5' delle molecole (e da G ad A alle estremità 3') possono essere quindi utilizzati per verificare l'effettiva antichità delle sequenze di aDNA ottenute (Sawyer *et al.*, 2012; Briggs *et al.*, 2007). Sfruttando il *software* mapDamage2.0 (Jonsson *et al.*, 2013), abbiamo stimato l'incidenza delle sostituzioni nucleotidiche nelle molecole mappanti sul genoma di elefante africano: in tutti i campioni la deaminazione è praticamente assente, ad eccezione del reperto AE-378 che mostra una percentuale di C>T pari al 17,42% e G>A pari a 18,01% indicando la presenza, per questo campione, di molecole antiche (*tab.* 3). Per questa ragione solo il campione AE-378 è stato sottoposto alle successive fasi sperimentali, processando in parallelo due diverse librerie genetiche ottenute dallo stesso estratto.

Dall'analisi di arricchimento per l'mtDNA sono state ottenute poche reads mappanti su tutti e tre i genomi mitocondriali utilizzati (*Loxodonta africana*, *Elephas maximus* e *Mammuthus primigenius* (*tabb.* 4-6). La ricerca su BLAST

dei frammenti allineati ha messo in evidenza come questi si vadano a posizionare nelle regioni conservate delle tre specie, non consentendo pertanto di effettuare un'attribuzione tassonomica certa.
Dall'analisi molecolare è emerso uno stato di conservazione non ottimale dei reperti analizzati. Già in fase di campionamento i frammenti sono risultati estremamente friabili e poco compatti, anticipando una bassa preservazione del DNA. Il basso numero di molecole mappanti (anche dopo la fase di cattura dei frammenti *target*) sui genomi di riferimento, l'elevata frammentazione (sono stati ottenute sequenze con una dimensione media di circa 35 paia di basi (*tabb.* 3-6) e la bassa complessità delle librerie genetiche che si evince da un valore alto di cluster factor (*tabb.* 4-6) hanno confermato la forte degradazione del materiale genetico, probabilmente dovuta alle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente deposizionale.

5. Conclusioni

Le indagini condotte sui resti in avorio di Montefortini descritti in questo capitolo hanno permesso di determinare la sua provenienza da proboscidati. I dati micromorfologici e micromorfometrici ottenuti dalle analisi zooarcheologiche condotte attraverso la videomicroscopia 3D suggeriscono che l'avorio utilizzato dagli Etruschi di Montefortini potrebbe anche derivare da *Mammuthus* sp. Sui reperti analizzati, le caratteristiche della struttura di Schreger utili all'identificazione specifica dei proboscidati sono infatti compatibili con quelle relative a *taxa* appartenenti a questo genere, discostandosi da quelle di *Elephas maximum* e *Loxodonta africana.* Sebbene il presente studio dimostri come la videomicroscopia 3D possa rappresentare un metodo di indagine non invasivo utile per l'esame di resti di avorio provenienti da contesti archeologici, la sua validazione nella discriminazione delle specie di proboscidati necessita però di ulteriori analisi. Lo sfruttamento da parte delle maestranze etrusche della dentina di proboscidati estinti migliaia di anni prima della realizzazione dei manufattianziché di avorio ricavabile da specie coeve, rimane, al momento, un'interessante possibilità che deve essere indagata e confermata da ricerche più approfondite. Al riguardo, è comunque da sottolineare che l'alterazione delle caratteristiche chimico-fisiche che l'avorio può subire a causa dei processi di fossilizzazione spinge a considerare che solo la dentina di mammut crioconservati possa aver rappresentato per gli Etruschi una materia prima fossile utile alla lavorazione. Una eventuale conferma della presenza di avorio di mammut testimonierebbe dunque l'approvvigionamento di avorio da parte degli abitanti di Comeana dall'Europa nord-orientale dove si trovano numerosi depositi di permafrost e da dove proviene anche l'ambra recuperata nel tumulo.
Gli esami paleogenetici condotti su alcuni resti per i quali l'analisi zooarcheologica suggeriva l'attribuzione a *Mammuthus* sp., non hanno potuto fornire un'attribuzione tassonomica specifica a causa dello stato di preservazione del DNA nei reperti, che ha consentito solo di confermare la provenienza dell'avorio da proboscidato. D'altra parte, la rilevazione della scarsa preservazione del materiale genomico evidenzia un importante aspetto riguardante la storia tafonomica dei reperti analizzati. Se infatti a livello macroscopico essi presentano, seppur frammentati, un buon stato di conservazione che permette una dettagliata analisi stilistica e morfologica dei motivi decorativi, la struttura microscopica appare assai meno ben preservata. Fenomeni post deposizionali non ben identificati hanno provocato la formazione di numerose microfratture e la deposizione di tenaci microconcrezioni provocando una notevole fragilità della dentina, cui si aggiunge una forte alterazione della composizione chimica originale. Come emerso dalle analisi paleogenetiche, i fenomeni degradativi hanno purtroppo interessato anche la matrice organica dei reperti impedendo di ottenere materiale genetico informativo.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il dott. Nicola Conti per la realizzazione delle sezioni sottili dei reperti, il dott. Andrea Scala per il supporto offerto nelle analisi di queste al microscopio ottico polarizzatore e il prof. Marco Giamello per l'utilizzo del videomicroscopio 3D, tutti afferenti al Dipartimento di Scienze fisiche della Terra e dell'Ambiente dell'Università di Siena.

Riferimenti bibliografici

Abelova M. (2008). Schreger pattern angles of *Mammuthus primigenius* tusk: analytical approach and utility. *Bulletin of Geosciences* 83 (2), pp. 225-232.

Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E.W. et al. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, pp. 403-410.

Bettini M.C., Nicosia F., Poggesi G. (2011). CR15. Comeana. Tumulo di Montefortini. In: Perazzi P., Poggesi G. (a cura di), *Carta archeologica della provincia di Prato dalla preistoria alla fine dell'età romana*. Firenze: All'Insegna del Giglio, pp. 349-361.

Boschin F., Crezzini J. (2012). Morphometrical analysis on cut Marks using a 3D digital microscope. *International Journal of Osteoarchaeology* 22, pp. 549-562.

Briggs AW, Stenzel U, Johnson PL, Green RE, Kelso J, Prüfer K, Meyer M, Krause J, Ronan MT, Lachmann M, Pääbo S. (2007). Patterns of damage in genomic DNA sequences from

a Neandertal. *PNAS* 104(37), pp. 14616-21. doi: 10.1073/pnas.0704665104.

Cardinali I., Tancredi D., Lancioni, H. (2023). The Revolution of Animal Genomics in Forensic Sciences. *Int. J. Mol. Sci*. 24, 8821. https://doi.org/10.3390/ijms24108821.

Colonna G. (2000). La cultura Orientalizzante in Etruria. In: Dore A., Marchesi M., Minarini L., a cura di, *Principi etruschi tra Mediterraneo ed Europa.* Catalogo della mostra (Bologna, 1° ottobre 2000-1 aprile 2001). Venezia: Marsilio, pp. 55-65.

Crezzini J., Tarantini M., Bettini M. C. (2022). Ivory identification in the archaeological contexts. A case study using the 3D digital microscopy, In: *IMEKO TC-4 International Conference on Metrology for Archaeology and Cultural Heritage* (University of Calabria, Italy, October 19-21). doi: https://www.imeko.org/publications/tc4-Archaeo-2022/IMEKO-TC4-MetroArchaeo2022-012.pdf

Crezzini J., Tarantini M., Bettini M. C. (2023). Analysis of the ivory remains from the Etruscan tumulus of Carmignano (Central Italy) using 3D digital microscopy. *Acta IMEKO*12 (4), pp. 1-7. doi: https://doi.org/10.21014/actaimeko.v12i4.1560

Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M.T., Weihmann A., Nickel B., Valdiosera C., García N., Pääbo S., Arsuaga J.L., Meyer M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *PNAS* 110 (39), pp. 15758-63. doi: 10.1073/pnas.1314445110.

Edwards H.G.M., Farwell D.W. (1995). Ivory and simulated ivory artefacts: Fourier transform Raman diagnostic study. *Spectrochimica Acta Part A* 51, pp. 2073-2081.

Edwards H.G.M., Farwell D.W., Holder J.M., Lawson E.E. (1997a). Fourier-transform Raman spectroscopy of ivory: II. Spectroscopic analysis and assignments. *Journal of Molecular Structure* 435, pp. 49-58.

Edwards H.G.M., Farwell D.W., Holder J.M., Lawson E.E.(1997b). Fourier-transform Raman spectroscopy of ivory: III. Identification of mammalian specimens. *Spectrochimica Acta Part A* 53, pp. 2403-2409.

Edwards H.G.M., Farwell D.W., Holder J.M., Lawson E.E. (1998). Fourier transform Raman spectroscopy of ivory: a non-destructive diagnostic technique. *Studies in Conservation* 43, pp. 9-16.

Edwards H.G.M., Hassan N.F.N., Arya N. (2006). Evaluation of Raman spectroscopy and application of chemometric methods for the differentiation of contemporary ivory specimens I: Elephant and mammalian species. *Journal of Raman Spectroscopy* 37 (1-3), pp. 353-360. doi: https://doi.org/10.1002/jrs.1458

Epp L.S., Zimmermann H.H., Stoof-Leichsenring K.R. (2019). Sampling and Extraction of Ancient DNA from Sediments. *Methods in molecular biology* 1963, pp. 31-44. doi: 10.1007/978-1-4939-9176-1_5

Espinoza E.O., Mann M.J. (1991). *Identification guide for ivory and ivory substitutes*. Baltimore: World Wildlife Fund and The Conservation Foundation.

Espinoza E.O., Mann M.J. (1992). *Identification guide for ivory and ivory substitutes (second edition)*. Baltimore: World Wildlife Fund and The Conservation Foundation.

Gallini V., Sala B. (2001). Settepolesini di Bondeno (Ferrara-Eastern Po Valley): the first example of mammoth steppe. In: Cavarretta G., Gioia P., Mussi M., Palombo M.R., a cura di, *Italy. The World of Elephants.* Atti del convegno (Roma, ottobre 2001). Roma: CNR, pp. 272-275.

Gyria E., Khlopachev G.A. (2018). Experimental data on the splitting and knapping of mammoth tusks and reindeer antlers. In: Christensen M., Goutas N., a cura di, *À coup d'éclats! La fracturation des matières osseuses en Préhistoire*. Paris: Société préhistorique française (Séances, 13), pp. 325-340.

Hagan R.W., Hofman C.A., Hübner A., Reinhard K., Schnorr S., Lewis C.M. Jr,, Sankaranarayanan K., Warinner C.G. (2020). Comparison of extraction methods for recovering ancient microbial DNA from paleofeces. *American Journal of Physical Anthropology* 171(2), pp. 275-284. doi: 10.1002/ajpa.23978

Harney É., Cheronet O., Fernandes D.M., *et al.* (2021). A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth. *Genome Research* 3, pp. 472-483. doi: 10.1101/gr.267534.120

Heckel C. (2009). Physical characteristics of mammoth ivory and their implications for ivory work in the Upper Paleolithic. *Mitteilungen der Gesellschaft für Urgeschichte* 18, pp. 71-91.

Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., Haeseler A., Paabo S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research* 29, pp. 4793-4799.

Höss M., Jaruga P., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Pääbo S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* 24, pp. 1304-1307.

Jonsson H., Ginolhac A., Schubert M., Johnson P.L., Orlando L. (2013). mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics* 29, pp. 1682-1684.

Khlopatchev G.A. (2001). Mammoth tusk processing using the knapping technique in the Upper Paleolithic of the Central Russian Plain. In: Cavarretta G., Gioia P., Mussi M., Palombo M.R.,a cura di, *Italy. The World of Elephants.* Atti del convegno (Roma, ottobre 2001). Roma: CNR, pp. 444-447.

Lech T. (2016). Ancient DNA in historical parchments – identifying a procedure for extraction and amplification of genetic material. *Genetic molecolar research* 15(2). doi: 10.4238/gmr.15028661.

Li H., Durbin R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25(14), pp. 1754-60. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324.

Massini S., Arancio M. L., a cura di (2012). *Ambra. Dalle rive del Baltico all'Etruria*. Roma: Gangemi.

Meiklejohn K.A. *et al*. (2021). Current methods, future directions and considerations of DNA-based taxonomic identification in wildlife forensics. *Forensic Science International: Animals and Environments* 1. https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100030.

Meyer M., Kircher M. (2010). Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols* 6. doi: 10.1101/pdb.prot5448

Modi A., Pisaneschi L., Zaro V. *et al.* (2020). Combined methodologies for gaining much information from ancient dental calculus: testing experimental strategies for

simultaneously analysing DNA and food residues. *Archaeological Anthropological Sciences* 12, 10. https://doi.org/10.1007/s12520-019-00983-5

Modi A., Vergata C., Zilli C., Vischioni C., Vai S., Tagliazucchi G.M., Lari M., Caramelli D., Taccioli C. (2021). Successful extraction of insect DNA from recent copal inclusions: limits and perspectives. *Nature Scientific reports* 11: 6851. doi: 10.1038/s41598-021-86058-9

Mori C., Matsumura S. (2021). Current issues for mammalian species identification in forensic science: a review. *International Journal of Legal Medecine* 135. https://doi.org/10.1007/s00414-020-02341-w

Moretti E., Arrighi S., Boschin F., Crezzini J., Aureli D., Ronchitelli A. (2015). Using 3D Microscopy to Analyze Experimental Cut Marks on Animal Bones Produced with Different Stone Tools. *Ethnobiology Letters* 6 (2), pp. 267-75. http://www.jstor.org/stable/26423632.

Moussous A., Valensi P., Simon P. (2014). Identification de l'ivoire de Proboscidiens des grottes des Balzi Rossi (Ligurie, Italie) à partir de la méthode des lignes de Schreger. *Bulletin du Musée d'anthropologie préhistorique de Monaco* 54, pp. 83-90.

Onoratini G., Arellano A., Del Lucchese A., Moullé P., Serre F. (2012). The Barma Grande cave (Grimaldi, Vintimiglia, Italy): From Neandertal, hunter of "Elephas antiquus", to Sapiens with ornaments of mammoth ivory. *Quaternary International* 255, pp. 141-157.

Orlando L., Ginolhac A., Zhang G., Froese D., Albrechtsen A., Stiller M., Schubert M., Cappellini E, Petersen B., Moltke I., Johnson P.L., Fumagalli M., Vilstrup J.T., Raghavan M., Korneliussen T., Malaspinas A.S., Vogt J., *et al. (2013).* Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*. 499(7456), pp. 74-8. doi: 10.1038/nature12323

Palombo M.R., Villa P. (2001). Schreger lines as support in the Elephantinae identification. In: Cavarretta G., Gioia P., Mussi M., Palombo M.R., a cura di, *Italy. The World of Elephants.* Atti del convegno (Roma, ottobre 2001). Roma: CNR, pp. 656-660.

Palombo M.R., Ferretti M. P. (2005). Elephant fossil record from Italy: knowledge, problems, and perspectives. *Quaternary International* 126-128, pp. 107-136.

Palombo M.R., Ferretti M.P., Pillola G. L., Chiappini L. (2012). A reappraisal of the dwarfed mammoth Mammuthus lamarmorai (Major, 1883) from Gonnesa (south-western Sardinia, Italy). *Quaternary International* 255, pp. 158-170.

Peltzer A., Jäger G., Herbig A. *et al.* (2016). EAGER: efficient ancient genome reconstruction. *Genome Biology* 17, 60. https://doi.org/10.1186/s13059-016-0918-z.

Penniman T.K. (1952). Pictures of ivory and other animal teeth, bone, and antler. *Pitt Rivers Museum Occasional Papers on Technology* 5, pp. 1-37.

Posth C., Zaro V., Spyrou M.A., Vai S., Gnecchi-Ruscone G.A., Modi A., Peltzer A., Mötsch A., Nägele K., Vågene Å. J., Nelson E.A., Radzevičiūtė R., Freund C., Bondioli L.M., Cappuccini L., Frenzel H., Pacciani E., Boschin F., Capecchi G., Martini I., Moroni A., Ricci S., Sperduti A., Turchetti M.A., Riga A., Zavattaro M., Zifferero A., Heyne H.O., Fernández-Domínguez E., Kroonen G.J., McCormick M., Haak W., Lari M., Barbujani G., Bondioli L., Bos K. I., Caramelli D., Krause J. (2021). The origin and legacy of the Etruscans through a 2000-year archeogenomic time transect, *Science Advances 7 (39)*. Doi: 10.1126/sciadv.abi7673

Prozesky V.M., Raubenheimer E.J., Van Heerden W.F.P., Grotepass W.P., Przybylowicz W.J., Pineda C.A., Swart R. (1995). Trace element concentration and distribution in ivory. *Nuclear instruments and methods in Physics Research* B 104, pp. 638-644.

Raubenheimer E.J., Bosman M. C., Vorster R., Noffke C. E. (1998). Histogenesis of the chequered pattern of ivory of the African elephant (*Loxodonta africana*). *Archives of Oral Biology* 43, pp. 969-977.

Rustioni M., Ferretti M.P., Mazza P., Pavia M., Varola A. (2003). The vertebrate fauna from Cardamone (Apulia, southern Italy): an example of Mediterranean mammoth fauna, *Deinsea* 9 (1), pp. 395-404.

Sawyer S., Krause J., Guschanski K., Savolainen V., Pääbo S. (2012). Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA. *PLoS One* 7 (3). doi: 10.1371/journal.pone.0034131.

Schubert M, Ginolhac A, Lindgreen S. *et al.* (2012). Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes. *BMC Genomics* 13, 178. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-178

Shimoyama M., Maeda H., Sato H., Ninomiya T., Ozaki Y. (1997). Non destructive discrimination of biological materials by near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy and chemo-metrics: discrimination among hard and soft ivories of African elephants and mammoth tusks and prediction of specific gravity of the ivories. *Applied Spectroscopy* 51, pp. 1154-1158.

Shimoyama M., Nakanishi T., Hamanaga Y., Ninomiya T., Ozaki Y. (1998). Non-destructive discrimination between elephant ivory products and mammoth tusk products by glancing incidence X-ray fluorescence spectroscopy. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* 16, pp. 175-182.

Singh R.R., Goyal S. P., Khanna P. P., Mukherjee P.K., Sukumar R. (2006). Using morphometric and analytical techniques to characterize elephant ivory. *Forensic Science International* 162, pp. 144-151.

Trapani J., Fisher D.C. (2003). Discriminating proboscidean taxa using features of the Schreger pattern in tusk dentin. *Journal of Archaeological Science* 30, pp. 429-438.

Wagner S., Lagane F., Seguin-Orlando A., Schubert M., Leroy T., Guichoux E., Chancerel E., Bech-Hebelstrup I., Bernard V., Billard C., Billaud Y., Bolliger M., Croutsch C., Čufar K., Eynaud F., Heussner K.U., Köninger J., Langenegger F., Leroy F., Lima C., Martinelli N., Momber G., Billamboz A., Nelle O., Palomo A., Piqué R., Ramstein M., Schweichel R., Stäuble H., Tegel W., Terradas X., Verdin F., Plomion C., Kremer A., Orlando L. (2018). High-Throughput DNA sequencing of ancient wood. *Molecular Ecology* 27 (5), pp. 1138-1154.

Wales N., Kistler L. (2019). Extraction of Ancient DNA from Plant Remains. *Methods in Molecular Biology* 1963, pp. 45-55. Doi: 10.1007/978-1-4939-9176-1_6