



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

BIOLOGIA MARINA

La foca monaca (*Monachus monachus* Hermann, 1779) in Italia, fra estinzione e ricolonizzazione: evidenze dal DNA e dalla *Citizen Science*

The monk seal (*Monachus monachus* Hermann, 1779) in Italy, between extinction and recolonization: evidence from DNA and from *Citizen Science*

Tesi di Laurea Magistrale di

Francesca Trenta

Relatore: Chiar.mo Prof.

Vincenzo Caputo Barucchi

Sessione straordinaria Febbraio 2022

Anno Accademico 2020-2021

Indice

SCOPO DELLA TESI.....	1
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Sistematica e filogenetica.....	3
1.2 Morfologia, biologia ed etologia della specie.....	6
1.3 Genetica.....	15
1.3.1 DNA antico.....	22
1.3.2 DNA moderno.....	29
1.4 Minacce.....	32
1.5 Conservazione.....	42
1.6 Citizen science.....	46
2. MATERIALI E METODI.....	49
2.1 DNA antico.....	49
2.1.1 Campionamento.....	49
2.1.2 Estrazione del DNA.....	56
2.1.3 Amplificazione.....	63
2.1.4 Allineamento.....	66
2.1.5 Network aplotipico.....	67
2.2 DNA moderno.....	68
2.2.1 Campionamento.....	68
2.2.2 Estrazione del DNA.....	70
2.2.3 Amplificazione.....	71
2.2.4 Allineamento.....	72

2.2.5 Network aplotipico.....	73
2.3 Citizen science e avvistamenti di <i>Monachus monachus</i> in Italia.....	74
3. RISULTATI.....	77
3.1 DNA antico.....	77
3.2 DNA moderno.....	82
3.3 Citizen science.....	84
4. DISCUSSIONE.....	94
5. CONCLUSIONI.....	108
BIBLIOGRAFIA.....	110

SCOPO DELLA TESI

La foca monaca mediterranea (*Monachus monachus*, Hermann 1779) è l'unico pinnipede che abita il Mar Mediterraneo ed è la specie di foca più minacciata; infatti al giorno d'oggi ne restano circa 700 individui ma la popolazione sembra essere in ripresa (Karamanlidis et al. 2016a). Le principali minacce sono il deterioramento dell'habitat, l'uccisione volontaria, il bycatch, la diminuzione delle risorse trofiche ed eventi stocastici. Misure di conservazione possono includere sicuramente la protezione degli habitat, la mitigazione del conflitto tra predatore e pescatori, un aumento della ricerca scientifica sia sul campo che dal punto di vista genetico in laboratorio, incontri divulgativi con la popolazione e salvataggio e riabilitazione delle foche debilitate e/o orfane. Il suo antico areale comprendeva il Mar Mediterraneo, il Mar Nero, l'Oceano Atlantico dal nord della Spagna al sud del Marocco, le Isole Canarie, le Isole Azzorre e Madeira. Al giorno d'oggi la foca monaca mediterranea può essere osservata in tre grandi subpopolazioni presenti nella penisola di Cabo Blanco (Sahara occidentale), nell'arcipelago di Madeira e nel Mediterraneo orientale, principalmente tra Grecia, Cipro e Turchia (Karamanlidis et al. 2016a). Sempre più individui però sono osservati lungo le coste mediterranee lontano dalle colonie, segno che questo pinnipede sta riconquistando territori nei quali viveva

in passato.

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati attraverso il DNA antico e il DNA moderno dei campioni appartenenti a esemplari di *Monachus monachus* conservati in musei italiani e un campione appartenente ad un individuo che si è spiaggiato sulle coste pugliesi nel gennaio 2020 per risalire agli aplotipi mitocondriali di questa specie, comprendere eventuali movimenti migratori e mettere in pratica misure di conservazione. Si è voluto porre anche l'attenzione sulla "Citizen science" e su quanto questa nuova branca della scienza risulti essere molto utile per migliorare le conoscenze sulla distribuzione della foca monaca mediterranea.

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1 Sistematica e filogenetica

La foca monaca mediterranea (*Monachus monachus* Hermann, 1779) è un mammifero marino carnivoro (Classe: *Mammalia*, Ordine: *Carnivora*) appartenente alla famiglia *Phocidae* e alla sottofamiglia *Monachinae*. In questa famiglia sono compresi i generi *Monachus* ed il recentemente identificato *Neomonachus* (Scheel et al. 2014).

Recenti studi genetici suggeriscono che le foche monache (generi *Monachus* e *Neomonachus*) abbiano avuto origine nella regione della Tetide durante il Tortoniano (circa 12 milioni di anni fa) e da quel momento hanno occupato le acque temperate del Mar Mediterraneo (foca monaca mediterranea, *Monachus monachus*). Dal Mediterraneo si sono poi diffuse da est a ovest, prima verso i Caraibi (foca monaca dei Caraibi, *Neomonachus tropicalis*, oggi estinta) e poi nell'Oceano Pacifico (foca monaca delle Hawaii, *Neomonachus schauinslandii*, endemica delle Isole Hawaii) (Fyler et al. 2005).

La foca monaca dei Caraibi (*Neomonachus tropicalis* Gray, 1850) e la foca monaca delle Hawaii (*Neomonachus schauinslandii* Matschie, 1905) sono le due specie appartenenti al genere *Neomonachus*. La prima è attualmente

considerata estinta (Fig. 1) e la seconda, con una popolazione stimata di circa 1400 esemplari, è classificata come in pericolo critico di estinzione (Baker e Johanos 2004; Hairr 2001).



Fig. 1 – *Uno degli ultimi individui di foca monaca dei Caraibi*

La foca monaca mediterranea è l'unica specie ancora esistente che rappresenta il genere *Monachus* ed è fra i Mammiferi più in pericolo del mondo (Karamanlidis e Dendrinis 2015). I Pinnipedi sono i Carnivori presenti sulla Terra che più di tutti si sono adattati alla vita in mare in quanto ne rappresentano il ramo evolutivo che in un determinato periodo evolutivo (Oligocene, circa 30 milioni di anni fa) si è specializzato per la vita nell'ambiente acquatico. I Pinnipedi comprendono le famiglie *Otariidae* (otarie e leoni marini), *Odobenidae* (trichechi) e *Phocidae* (foche). Ancora non è chiaro se i Pinnipedi siano un gruppo monofiletico o un gruppo difiletico. Secondo l'ipotesi monofiletica ci sarebbe un solo antenato comune all'interno della famiglia *Ursidae* (orsi, panda). Secondo l'ipotesi difiletica (oggi meno accreditata) le

otarie e trichechi sarebbero derivati da un antenato comune con gli Ursidi mentre le foche deriverebbero dai Mustelidi (donnole, faine, lontre). Grazie ai reperti fossili è stato osservato che i Pinnipedi ancestrali erano molto simili alle lontre marine, soprattutto i Focidi, mentre otarie e trichechi potrebbero essersi evoluti da un gruppo affine agli orsi e poi queste due linee evolutive si sarebbero evolute in modo convergente così da presentare delle caratteristiche molto simili (secondo l'ipotesi difiletica). In tutto l'ordine dei Carnivori (sia terrestri che marini) i Pinnipedi sono gli unici a non avere l'osso lacrimale (osso nella parte mediale dell'orbita, tra osso frontale e osso mascellare) e questo suggerirebbe che siano un gruppo monofiletico (Berta et al. 2011).

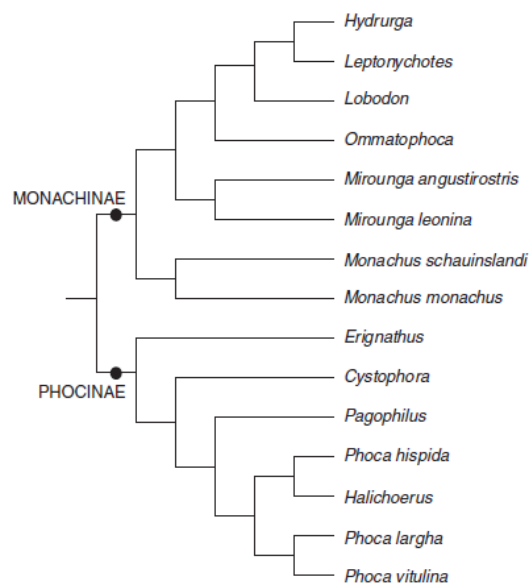


Fig. 2 – Filogenesi della famiglia Phocidae basata su dati molecolari. (Berta et al. 2011)

1.2 Morfologia, biologia ed etologia della specie

La foca monaca mediterranea è un Focide di taglia medio – grande. La lunghezza si attesta tra i 240 e i 250 cm circa. I cuccioli alla nascita misurano circa 1 metro di lunghezza e 15-25 kg di peso. Una foca monaca adulta può raggiungere un peso compreso tra i 240 e i 300 kg. Nella specie si nota un dimorfismo sessuale sia dal punto di vista del peso (le femmine sono solitamente più piccole e leggere), sia dal punto di vista del colore del mantello. I maschi adulti appaiono di colore nero con una grande chiazza bianca sul ventre che è unica per ogni individuo mentre le femmine adulte sono solitamente marroni o grigie, con la parte ventrale del corpo che mostra una colorazione più chiara (Dendrinis et al. 2017). I cuccioli hanno un mantello tra il nero e il marrone cioccolato con una chiazza bianca sul ventre e il pelame è morbido, lungo e lanoso (lanugine) (Badosa et al. 1998, Dendrinis 2011) (Fig. 3). La chiazza ventrale dei cuccioli spesso ha delle chiazze più piccole nere e varia in forma, dimensione e posizione tra i differenti individui e in base al sesso (Badosa et al. 1998). I giovani e gli adulti hanno un pelo molto corto e duro, lungo circa 0,5 cm. (Ling 1970). I maschi raggiungono la maturità sessuale intorno ai 6 anni di età mentre le femmine a 4 anni di età (Dendrinis et al. 2017). La gestazione dura tra i 9 e gli 11 mesi (Marchessaux and Pergent-Martini 1991, Pastor and Aguilar 2003), l'accoppiamento avviene in acqua

(Karamanlidis et al. 2016a) e ogni femmina dà alla luce un piccolo durante ogni ciclo riproduttivo (King 1956). La stagione dei parti si estende da maggio a dicembre, ma il picco (oltre il 44% su un campione di 57 osservazioni) è in settembre e ottobre (Marchessaux 1989). Poco prima del parto, le femmine solitamente si ritirano in aree isolate che difendono attivamente dalle altre foche che tentano di avvicinarsi (Layna et al. 1999). L'allattamento dura in genere 5 – 7 settimane (fino ad un massimo di 10) durante le quali il piccolo cresce molto rapidamente. A differenza di come era riportato in passato, è stato visto che la foca monaca mediterranea può dare alla luce un piccolo ogni anno (Pastor e Aguilar 2003).



Fig. 3 - *Morfologia della foca monaca mediterranea* (© Gruppo Foca Monaca)

La vita della foca monaca mediterranea, così come quella di tutti i Pinnipedi, è tuttora legata alla terra ferma, dove avvengono i parti e l'allattamento (Dendrinou et al. 2017) (Fig. 4).



Fig. 4 – *Una femmina di foca monaca mediterranea allatta il suo cucciolo sulla terra ferma*
(© Emanuele Coppola, Gruppo Foca Monaca)

L'alimentazione è prevalentemente carnivora e le analisi dei contenuti stomacali delle foche monache mediterranee indicano che si nutrono di una grande varietà di prede come Pesci ossei e cartilaginei (tra cui triglie, sparidi, mugilidi, cernie, carangidi, boghe, salpe, dentici, murene, gronchi, anguille e razze), Crostacei e Cefalopodi (Fig. 5).



Fig. 5 – *Una foca monaca mediterranea che si nutre di un polpo (© Jannik Peters)*

La foca monaca mediterranea è l'unico pinnipede che vive nel Mar Mediterraneo e uno dei Vertebrati più minacciati al mondo, infatti al giorno d'oggi ne restano circa 700 individui ma la popolazione sembra essere in aumento. Un tempo era distribuita in tutto il Mar Mediterraneo, nel Mar Nero e nelle acque dell'Oceano Atlantico settentrionale, dalla penisola di Cabo Blanco nel sud del Marocco alla Spagna settentrionale, incluse le Isole di Madeira, Azzorre e Canarie (Johnson et al. 2006, Gonzalez 2015). Individui vaganti sono stati osservati lungo le coste del Senegal, del Gambia, delle isole di Capo Verde e della Francia atlantica ma l'origine di questi individui è ignota (Johnson et al. 2006). Le foche monache sono state sfruttate dall'uomo fin dalla preistoria (Johnson and Lavigne 1999a, Johnson 2004, Stringer et al. 2008). Lo sfruttamento è stato particolarmente intenso durante l'epoca romana (Johnson

and Lavigne 1999a) e in alcune aree come le Isole Canarie, Madeira e la baia di Dhakla nel Sahara occidentale durante il Medioevo, quando le foche monache erano sfruttate commercialmente (Israels 1992, Johnson 2004, Brito 2012, Gonzalez 2015). La specie ha continuato ad essere perseguitata dai pescatori durante il XX secolo e ciò l'ha portata alla scomparsa dalla gran parte delle zone che occupava (Karamanlidis et al. 2016a).

Il range geografico attualmente occupato dalla specie è molto frammentato e si riscontrano 3 o 4 subpopolazioni isolate (Karamanlidis et al. 2016a). Nel Mediterraneo la specie si osserva soprattutto nella parte orientale, intorno alle isole del Mar Ionio e del Mar Egeo in Grecia (Adamantopoulou et al. 1999), lungo le coste della Grecia continentale, di Cipro e della Turchia occidentale e meridionale (Mursaloglu 1964, Gucu et al. 2004, 2009b, Guclusoy et al. 2004, Anonymous 2007b, Kirac et al. 2013). Nel versante turco del Mar Nero si pensa che le foche monache siano estinte dal 1997 (Kirac and Savas 1996, Kirac 2011). Alcuni individui sono sopravvissuti nel Mar di Marmara (Inanmaz et al. 2014).

La subpopolazione di foca monaca del Mediterraneo orientale è attualmente la più grande e si stima che sia costituita da circa 350 individui maturi sessualmente (Guclusoy et al. 2004, Anonymous 2007b, 2008b, 2009a).

Nel Nord Atlantico esistono 2 subpopolazioni: una è situata nella penisola di Cabo Blanco al confine tra Mauritania e Sahara occidentale (Gonzalez and Fernandez de Larrinoa 2012, Martinez – Jauregui et al. 2012) e una nell'arcipelago di Madeira (Pires et al. 2008).

La subpopolazione di Cabo Blanco contava circa 317 foche negli anni '90 ma una mortalità di massa nel 1997 ha ridotto la subpopolazione di più di due terzi (Forcada et al. 1999, Forcada and Aguilar 2000). Dopo questa moria di massa, la subpopolazione ha mostrato ottimi segni di recupero: nel 2013 erano presenti 159 individui adulti mentre attualmente sono presenti circa 220 individui, costituendo la seconda subpopolazione di foca monaca più grande al mondo (Martinez – Jauregui et al. 2012).

La terza subpopolazione più grande è localizzata nell'arcipelago di Madeira dove sono presenti circa 40 foche (Pires et al. 2008, Pires 2011).

Un numero non noto di foche monache potrebbe sopravvivere ancora lungo le coste mediterranee del Marocco orientale e forse in Algeria (Mo et al. 2011) ma senza un monitoraggio sistematico, lo stato e il destino di questa subpopolazione resta incerto.

Negli ultimi anni avvistamenti sporadici di individui di foca monaca sono stati riportati in nazioni dove la specie è considerata estinta come in Albania (Anonymous 2012), Croazia (Gomercic et al. 2011), Egitto (Di Sciara e Fouad

2012), Israele (Scheinin et al. 2011), Italia (Mo 2011), Libano (Anonymous 2010b), Spagna (Anonymous 2008b), Libia (Alfaghi et al. 2013) e Siria (Abou – Zahra 2013).

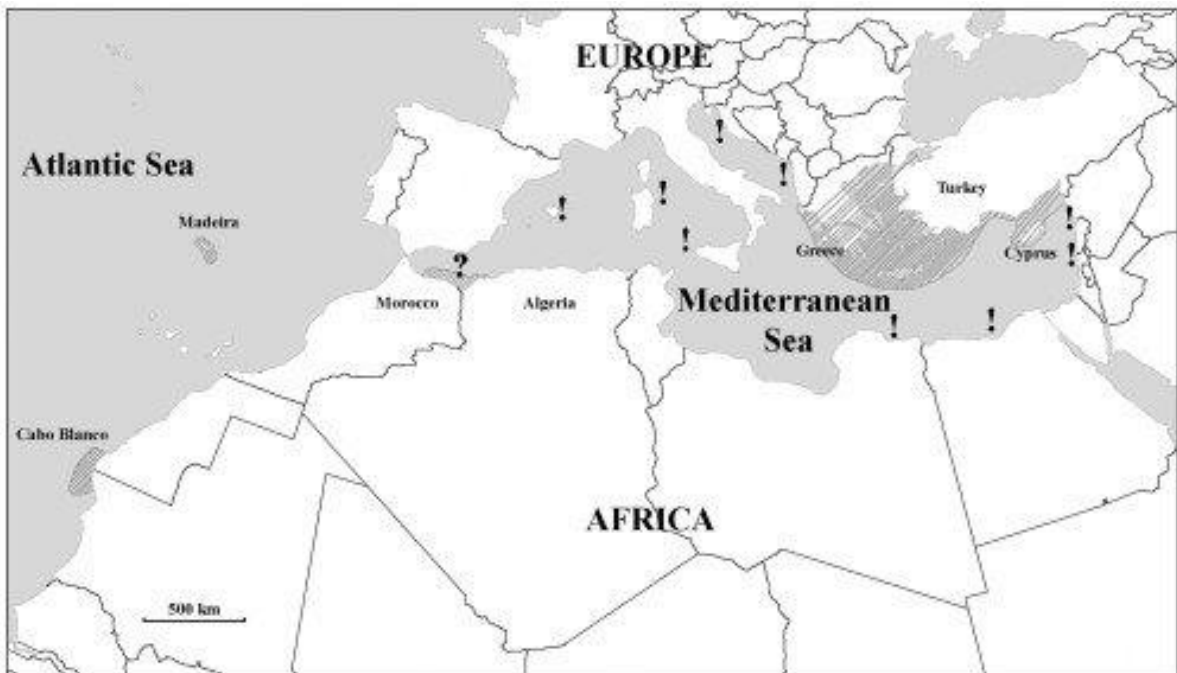


Fig. 6 - Mappa del Mar Mediterraneo e del Nord Africa, che indica l'attuale distribuzione della foca monaca mediterranea e alcune delle località citate nel testo. Le aree tratteggiate rappresentano le aree in cui sono presenti le attuali colonie; il punto interrogativo indica un'area in cui non si conosce lo stato della popolazione; i punti esclamativi indicano aree al di fuori dell'attuale areale dove sono state recentemente avvistate foche monache mediterranee. (Karamanlidis et al. 2016b)

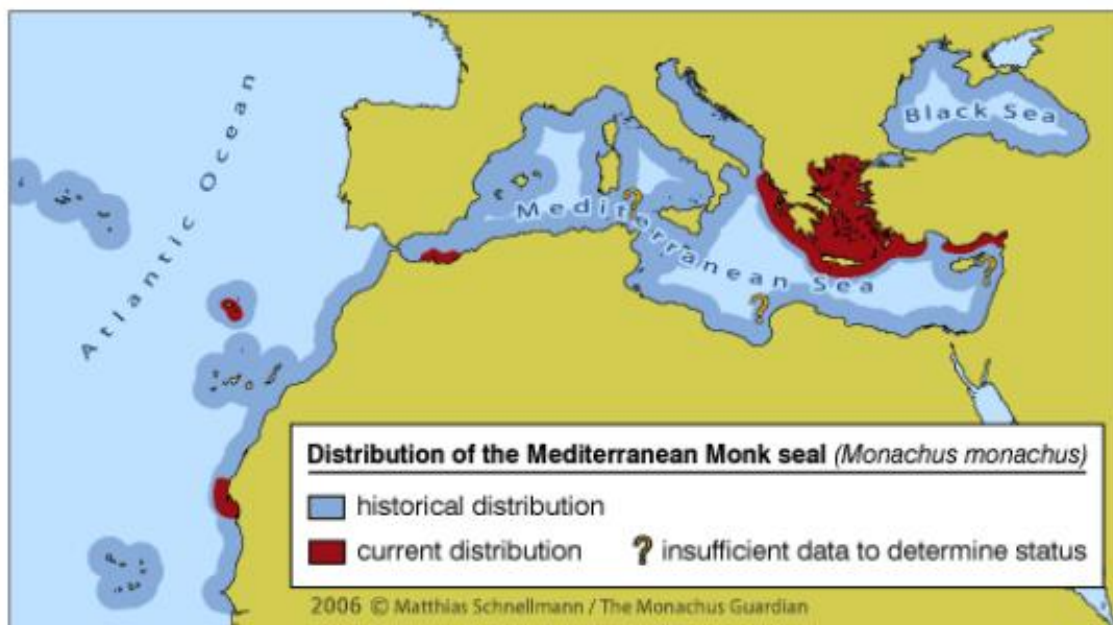


Fig. 7 – Confronto tra la distribuzione attuale e la distribuzione storica della foca monaca mediterranea

Prove storiche suggeriscono che le foche monache del Mediterraneo una volta sostavano nelle spiagge aperte (Johnson and Lavigne 1999a, Johnson 2004, Gonzalez 2015), come tuttora a Cabo Blanco. In tempi più recenti è stato osservato che frequentano scogliere rocciose dove usano le grotte marine per riposarsi, partorire e allattare (Karamanlidis et al. 2016a). La riproduzione all'interno delle grotte non sembra però l'ideale perché i cuccioli possono separarsi dalle madri durante le tempeste e possono affogare o morire di stenti. (Karamanlidis et al. 2016a). Si pensa che l'occupazione di questi spazi non ottimali sia un recente adattamento in risposta alla pressione antropica (Johnson and Lavigne 1999a, Johnson 2004). Nelle aree in cui sono state messe in atto misure di conservazione e/o l'attività antropica è bassa, le foche frequentano le

spiagge aperte e in certe occasioni sono stati registrati parti in queste aree (Pires and Neves 2000c, Fernandez de Larrinoa et al. 2007, Dendrinis et al. 2008).

1.3 Genetica

Le analisi genetiche del DNA mitocondriale e nucleare (Pastor et al. 2004, 2007, Karamanlidis et al. 2014b) hanno evidenziato che, come conseguenza di un forte collo di bottiglia subito dalla popolazione di foca monaca mediterranea e di una frammentazione della popolazione, tutte le subpopolazioni mostrano bassi livelli di diversità genetica (Karamanlidis et al. 2016a). Infatti, la diversità del DNA mitocondriale della foca monaca del Mediterraneo è fra le più basse registrate tra le specie di Pinnipedi (Karamanlidis et al. 2014b). Una bassa diversità genetica è un fattore importante per la conservazione delle specie a rischio di estinzione perché, combinata con l'inbreeding, riduce la fertilità e aumenta la mortalità dei cuccioli, determinando così una limitata capacità di una specie in via di estinzione di far fronte ai cambiamenti ambientali (Frankham 1995).

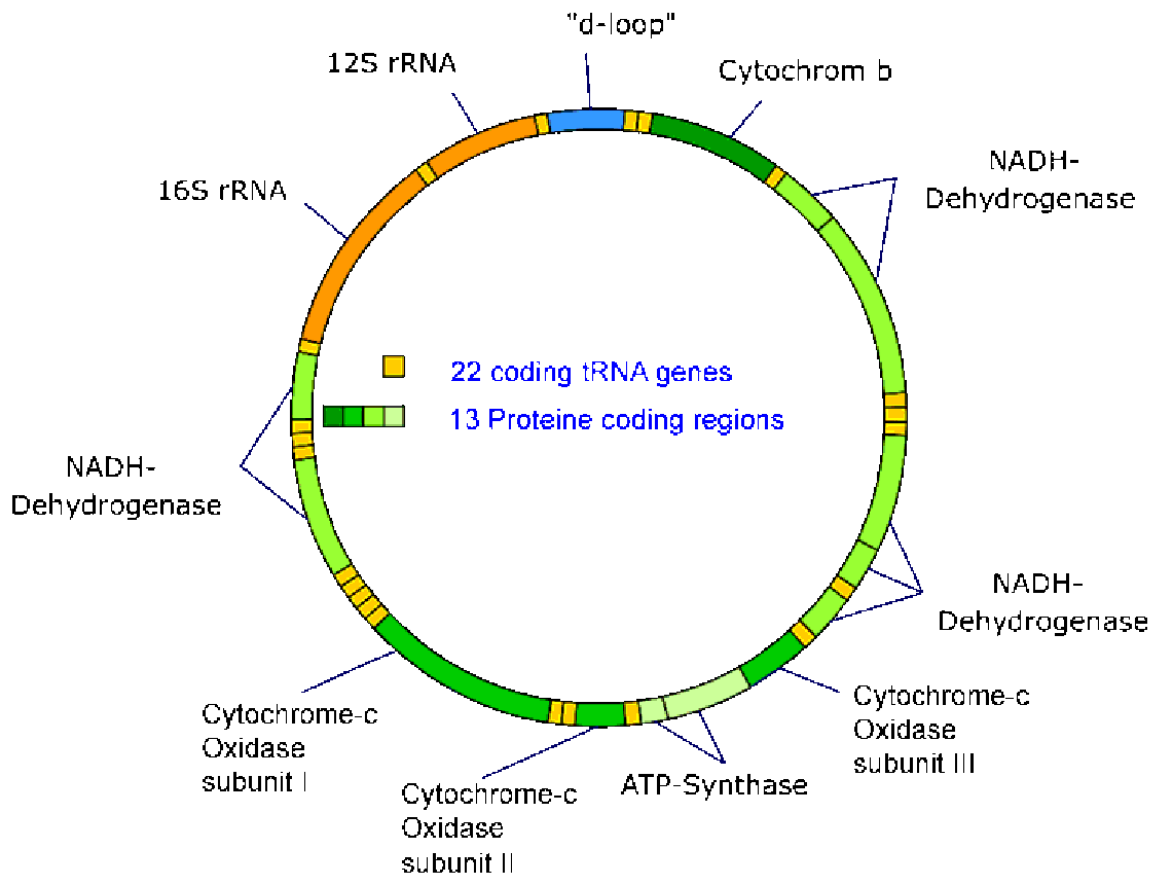


Fig.8 - *Struttura del DNA mitocondriale di un vertebrato*

L'uso di campioni storici ha permesso una valutazione diretta della diversità genetica persa nel corso degli anni (Rosenbaum et al. 2000). Analizzando il DNA mitocondriale sono stati riscontrati 7 aplotipi negli esemplari presi in considerazione (Karamanlidis et al. 2016b, Gaubert et al. 2019) ma è probabile che l'aplotipo MM07, che è stato registrato in 2 campioni museali provenienti dalla Francia e dalla Croazia, si sia estinto perché non è stato mai registrato nei 180 campioni recenti analizzati (Karamanlidis et al. 2016b, Gaubert et al. 2019).

Gli aplotipi hanno una somiglianza che va dal 99,4 al 99,8% (Karamanlidis et al. 2016b). MM01 è l'aplotipo ancestrale della foca monaca mediterranea e gli altri aplotipi si sono generati da esso attraverso mutazioni nei siti polimorfici (Karamanlidis et al. 2016b).

Gli aplotipi mitocondriali non avevano in passato una distribuzione così confinata geograficamente rispetto ad oggi e questo suggerisce che le estinzioni locali avvenute in tempi più o meno recenti abbiano prodotto una netta separazione tra il Mar Mediterraneo orientale e l'Oceano Atlantico settentrionale (Gaubert et al. 2019).

L'aplotipo MM01 è molto diffuso nel Mar Egeo, nel Mar Ionio, nel Mar Adriatico e nel Mar Libico ma appartiene anche al primo campione sequenziato proveniente dalle coste della Cilicia (Danyer et al. 2013, 2014), ai campioni storici provenienti dal Mar Mediterraneo occidentale, precisamente dal Mar Tirreno e dal Mar di Sardegna e caratterizza un campione proveniente dalla penisola di Cabo Blanco a seguito della grande moria, quindi a circa 4000 km ad ovest (Gaubert et al. 2019).

L'aplotipo MM05 oltre agli individui del Nord Atlantico, è stato ritrovato anche nel Mediterraneo occidentale (Mare di Alboran) sia in un campione recente proveniente dal Marocco sia in un campione storico proveniente dall'Algeria (Gaubert et al. 2019).

L'aplotipo

MM02 è distribuito nel Mar Egeo centrale e settentrionale (Karamanlidis et al. 2016b) ma è stato ritrovato anche in un esemplare proveniente dalla popolazione estinta del Mar Nero (Kirac 2011).

MM04, un raro aplotipo inizialmente trovato in un solo individuo proveniente dal Mar Egeo (Karamanlidis et al. 2016b), è stato trovato anche molto più ad ovest in due campioni storici provenienti dal Mar Ligure e dal Mar di Sardegna (Gaubert et al. 2019). Data la bassa frequenza di questo aplotipo nel Mar Egeo (<1,0%) e il numero relativamente basso di campioni dai mari italiani (n = 9), il ritrovamento di MM04 in più del 20% dei campioni storici italiani potrebbe essere indice di un aplotipo un tempo frequente nei mari italiani ed ora in via di estinzione. Ulteriori campionamenti dovranno essere effettuati per valutare se le piccole colonie superstiti che potrebbero abitare le acque tirreniche sardo-nordafricane (Mo 2011) rappresentano una delle ultime riserve per questo aplotipo, o se MM04 proviene dalla popolazione in via di recupero del Mediterraneo orientale (Gaubert et al. 2019).

Infine l'aplotipo MM03 è comune nelle foche monache mediterranee che vivono nelle isole greche del Mar Ionio (Karamanlidis et al. 2016b). Le due aree principali attualmente abitate dalla foca monaca mediterranea sono separate da circa 4000 km e sembrano essere geneticamente isolate (Harwood et al. 1996, Pastor et al. 2004, 2007 Karamanlidis et al. 2016b).

	MAR NERO	CILICIA	MAR LIBICO	MAR EGEO	MAR IONIO	MAR ADRIATICO	MAR TIRRENO	MAR LIGURE	SARDEGNA	MARE DI ALBORAN	CABO BLANCO	MADEIRA	NON NOTO
MM01	0	2	1	84	2	3	2	0	1	0	1	0	6
MM02	1	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MM03	0	0	0	0	10	1	0	0	0	0	0	0	0
MM04	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
MM05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	49	4	1
MM06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
MM07	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
TOTALE	1	2	1	113	12	5	2	1	2	2	51	4	8

Tab. 1 – Distribuzione degli aplotipi in base ai campioni di DNA antico e DNA moderno analizzati da Karamanlidis et al. (2016b) e da Gaubert et al. (2019) nei loro studi

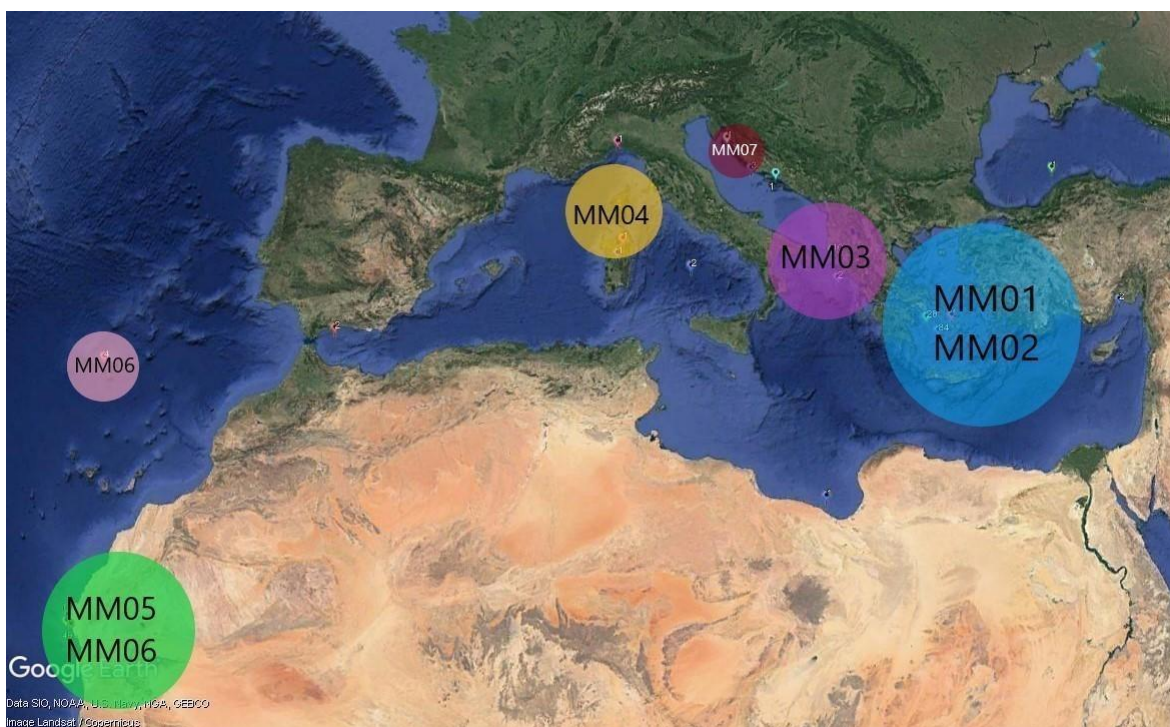


Fig. 9 – Mappa che illustra la distribuzione degli aplotipi di foca monaca mediterranea prendendo come riferimento gli studi di Karamanlidis et al. (2016b) e di Gaubert (2019)

Tuttavia, la condivisione di aplotipi tra le popolazioni dell'Oceano Atlantico settentrionale e del Mar Mediterraneo supporta l'ipotesi che in passato questo Pinnipede costituisse una metapopolazione con flusso genico che collegava l'Atlantico fino al Mar Nero probabilmente tramite popolazioni

geograficamente intermedie attualmente estinte (Pastor et al. 2007).

In definitiva, la bassa diversità genetica attuale e l'isolamento fra le popolazioni osservato nella foca monaca mediterranea potrebbe essere spiegato da una serie di estinzioni locali avvenute nel passato unite all'effetto della deriva genetica su una piccola popolazione che aveva già bassi livelli di polimorfismo (Gaubert et al. 2019).

Analizzando la subpopolazione del Mediterraneo orientale e la subpopolazione del Sahara occidentale è stato osservato che la variazione genetica è bassa in entrambe le subpopolazioni, con una ricchezza allelica media per i loci polimorfici pari a 2,09 e 1,96 rispettivamente. (Pastor et al. 2007). Sono stati valutati 24 loci microsatellite inizialmente isolati in altri Pinnipedi compresi la foca grigia *Halichoerus grypus*, la foca comune *Phoca vitulina*, l'elefante marino settentrionale *Mirounga angustirostris* ed il tricheco *Odobenus rosmarus*. Questi loci includono 8 loci monomorfici e 15 loci polimorfici già presi in considerazione nello studio di Pastor et al. (2004) e 3 loci che non sono mai stati valutati per la foca monaca mediterranea. I 24 loci sono Hg1.3, Hg3.6, Hg4.2, Hg6.1, Hg6.3, Hg8.9, Hg.10, Hgdiii, SGPv2, SGPv9, SGPv10, SGPv11, SGPv16, SGPv17, Pvc1, Pvc26, Pvc43, Pvc63, Pvc78, TBPV2, M11C, ORR2, ORR3, ORR9 (Pastor et al. 2007). Per la maggior parte dei loci, le distribuzioni delle frequenze alleliche osservate in entrambe le

subpopolazioni sono discontinue e l'ampiezza del range è simile (Pastor et al. 2007).

La variazione genetica del DNA nucleare delle due subpopolazioni rimanenti di *Monachus monachus* è molto bassa (Pastor et al. 2007). I bassi livelli di variazione sono da attribuire alla sua storia demografica, con la caccia commerciale che ha drasticamente ridotto il numero di individui durante il XVII secolo (Marchessaux 1989, Pastor et al. 2004) e più recentemente la distruzione degli habitat ha ulteriormente ridotto la popolazione (Pastor et al. 2007).

La mancanza di alleli rari e le distribuzioni discontinue delle frequenze alleliche suggeriscono una riduzione recente del numero di individui della popolazione con conseguente perdita di diversità genetica (Luikart et al. 1998, Garza e Williamson 2001).

1.3.1. DNA antico

Negli ultimi due decenni, la ricerca sul DNA antico è progredita dal recupero di piccoli frammenti di DNA mitocondriale da alcuni esemplari del tardo Olocene a studi su larga scala di popolazioni antiche, loci nucleari fenotipicamente importanti e persino intere sequenze del genoma mitocondriale di specie estinte (Willerslev e Cooper 2005).

Il DNA antico è il DNA estratto da materiale biologico come denti, ossa, pelli, tessuti mummificati naturalmente e scaglie dei pesci. Questi materiali possono provenire da reperti presenti nei musei, materiale archeologico o resti paleontologici e hanno un'età compresa tra decine di anni e circa centomila anni (Lindahl 1993). Il DNA in tutti questi materiali biologici è degradato ed è quindi più difficile da analizzare rispetto al DNA moderno che risulta essere di migliore qualità (Leonard 2008).

Il DNA endogeno è generalmente limitato a concentrazioni molto basse di frammenti corti e danneggiati di loci multicopia come il DNA mitocondriale (mtDNA). L'invenzione della reazione a catena della polimerasi (PCR) ha permesso di amplificare e studiare anche singole molecole sopravvissute, consentendo di poter studiare in maniera più rapida il DNA antico (Pääbo 1989, Pääbo e Wilson 1988, Pääbo et al. 1989, Thomas et al. 1989). Tuttavia, l'enorme potere di amplificazione della PCR ha anche creato una maggiore sensibilità

alla contaminazione dal DNA moderno e, contemporaneamente, crea una maggiore fonte di contaminazione attraverso le elevate concentrazioni dei prodotti precedentemente amplificati con la PCR. Di conseguenza, i falsi positivi risultanti dalla contaminazione all'interno del laboratorio rimangono un grosso problema nella ricerca sul DNA antico

I recenti progressi nella conoscenza del tempo e della modalità del danno al DNA, della contaminazione del campione e della diagenesi biochimica hanno migliorato gli standard e il DNA antico sta ora emergendo come una disciplina scientifica praticabile. Una serie di studi su larga scala ha iniziato a rivelare il vero potenziale del DNA antico per registrare i metodi e i processi dell'evoluzione, fornendo un modo unico per testare modelli e ipotesi comunemente usati per ricostruire modelli di evoluzione, genetica delle popolazioni e cambiamenti paleoecologici.

L'instabilità post mortem degli acidi nucleici è al centro dei problemi metodologici che interessano le ricerche sul DNA antico (Willerslev e Cooper 2005). Il danno al DNA si accumula nel tempo nelle cellule inattive (morte o dormienti) a causa di fattori come l'idrolisi e l'ossidazione spontanee e di conseguenza i campioni più antichi non contengono alcun DNA endogeno amplificabile, mentre i campioni meno antichi che ancora hanno del DNA contengono solo frammenti di dimensioni pari a 100-500 bp (Pääbo 1989,

Handt et al. 1994, Höss et al. 1996).

Le prime ricerche hanno mostrato che il decadimento del DNA post mortem era caratterizzato da rotture del filamento, siti privi di base, lesioni di codifica errata e collegamenti incrociati e che questi causavano sia artefatti di sequenziamento che l'amplificazione preferenziale del DNA contaminante non danneggiato (Pääbo 1989, Lindahl 1993, Höss et al. 1996)

Il DNA antico, come già detto, molto spesso è degradato e/o spezzato e normalmente non si riescono ad amplificare frammenti di DNA superiori a 150-200 bp anche se lo scopo è quello di ottenere frammenti lunghi circa 1000 bp. Quindi, per ottenere un frammento abbastanza lungo, si disegnano dei primer sovrapposti che intercettano dei tratti non più lunghi di 150-200 bp che possono essere successivamente collegati, arrivando così a circa 1000 bp.

Le basse temperature costanti giocano un ruolo centrale nella longevità delle molecole di DNA antico (Lindahl 1993, Hofreiter et al. 2001b, Smith et al. 2001, Willerslev et al. 2004b). Altre caratteristiche, come il rapido essiccamento e le elevate concentrazioni di sale possono anche prolungare la sopravvivenza del DNA (Lindahl 1993).

Un altro problema da affrontare quando si lavora con il DNA antico è la possibilità che ci siano delle contaminazioni. Poiché una goccia di aerosol può facilmente contenere mille volte la quantità di DNA mitocondriale

amplificabile che si trova in 1 g di molti antichi campioni umani (10⁵–10⁶ copie; Handt et al. 1996, Cooper et al. 2001b), i laboratori dove si lavora con il DNA antico devono essere completamente isolati sia fisicamente che logisticamente, preferibilmente in edifici liberi da ogni ricerca di biologia molecolare. Inoltre, il movimento giornaliero del personale dovrebbe procedere solo dai laboratori dove si lavora con il DNA antico a quelli dove si lavora con il DNA moderno (Willerslev e Cooper 2005).

L'uomo, il DNA e le cellule sono onnipresenti in tutti gli ambienti di laboratorio. È prudente presumere che tutti i reagenti e gli strumenti di laboratorio siano contaminati da DNA umano e microbico quando arrivano dal produttore. È essenziale una pulizia approfondita dei reagenti e degli strumenti, con una decontaminazione completa tramite raggi UV o ipoclorito di sodio (Willerslev e Cooper 2005). Tutti i lavori di estrazione devono essere eseguiti con indumenti protettivi e l'area di lavoro pulita regolarmente con ossidanti come candeggina e irradiata con raggi UV (Pääbo et al. 2004).

Negli ultimi due decenni è stato sviluppato un semplice insieme di criteri per rilevare la contaminazione di laboratorio (Pääbo 1989, Cooper e Poinar 2001) e ciò include il bianco di estrazione e i controlli per la PCR (Willerslev e Cooper 2005).

Le analisi del DNA antico di resti storici, archeologici e paleontologici possono

fornire importanti informazioni per la conservazione di popolazioni e specie che non possono essere ottenute in altro modo (Leonard 2008). Andare “indietro nel tempo” per studiare le popolazioni passate rimuove molti dei presupposti che minano le conclusioni basate solo sulle popolazioni recenti (Leonard 2008). Un'accurata caratterizzazione della dimensione storica della popolazione, dei livelli di flusso genico e delle relazioni con altre popolazioni sono fondamentali per sviluppare piani di conservazione e di gestione appropriati (Leonard 2008). L'attenzione dei biologi della conservazione è spesso focalizzata sulle specie minacciate o in via di estinzione. Questi hanno spesso piccole dimensioni della popolazione che accelerano la deriva genetica casuale portando a un rapido declino della diversità genetica e all'aumento della differenziazione della popolazione. La capacità di misurare direttamente la diversità genetica che era presente nelle popolazioni passate consente la stima delle dimensioni della popolazione passata, dei livelli di flusso genico e della parentela tra le popolazioni prima delle forti perturbazioni causate dagli esseri umani negli ultimi secoli o altri eventi discreti (Ramakrishnan et al. 2005). Questi parametri della popolazione sono fondamentali per la gestione della fauna selvatica e per la definizione degli obiettivi di conservazione (Leonard 2008).

Nello studio di Gaubert et al. del 2019 è stato analizzato il DNA antico di foca

monaca mediterranea attraverso la regione di controllo mitocondriale e prendendo in considerazione ossa, pelle imbalsamata e tessuti connettivi. Per i campioni storici sono state disegnate appositamente 4 paia di primer specifici amplificando frammenti parzialmente sovrapposti di lunghezza pari a 150 bp o di lunghezza inferiore a 150 bp, per ottenere un frammento di 484 bp che include tutti i siti variabili di CR1 osservati nella foca monaca mediterranea. Le coppie di primer sono CRms21F – CRms208R, CRms169F – CRms356R, CRms296F – CRms485R e MSDL_F395 – MMS_dlp564-R (Karamanlidis et al. 2016b, Gaubert et al. 2019).

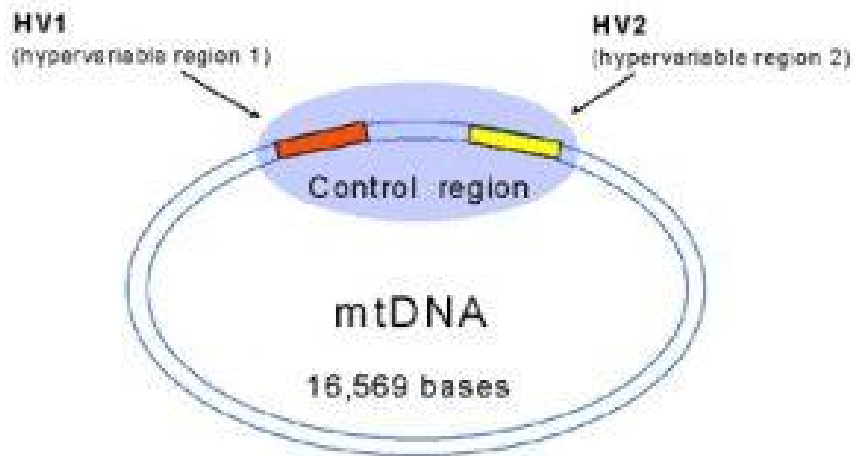


Fig. 10 – DNA mitocondriale in cui è evidenziata la regione di controllo

COPPIE DI PRIMER	SEQUENZA DEL PRIMER	T° ANNEALING	LUNGHEZZA DEL FRAMMENTO (bp)
CRms21F	ATCCCTAGCGGCCCTATGTA	57°C	148
CRms208R	GTTGTTGGTTTCACGAGGCC	57°C	148
CRms169F	TCCACGAGCCTTAATCACCA	55°C	147
CRms356R	CGAGATGTCCCATTTGAAGGG	55°C	147
CRms296F	ACTTCAGGGCCATGAAAGCT	55°C	150
CRms485R	TTTGACTGCGTCGAGACCTT	55°C	150
MSDL_F395	TGTGGTGCATGCATTTGGT	62°C	110
MMS-dIp564-R	TGCGCCTCATGGTTGTATGA	62°C	110

Tab. 2 – Coppie di primer usate per lo studio

1.3.2. DNA moderno

Il DNA moderno è quel DNA che viene estratto da individui vivi o morti da poco tempo oppure da resti biologici freschi. Trattandosi di tessuti e/o organi freschi, il DNA può essere estratto da varie parti dell'organismo come fegato, muscoli, reni, pelle, polmoni ma anche da resti organici come feci o saliva rimasta su resti di predazione. Il DNA moderno necessita di minori attenzioni rispetto al DNA antico dato che la quantità di DNA contenuta in un tessuto fresco è molto maggiore rispetto ad un reperto museale o addirittura preistorico e di conseguenza non necessita di laboratori appositi né di strumentazioni e cappe riservate solo a questa tipologia di DNA. Nei tessuti metabolicamente attivi il danno alle molecole di DNA viene riparato rapidamente ed efficacemente attraverso una serie di vie di riparazione (Lindahl 1993) e risulta essere quindi più integro e più facile da estrarre e da analizzare.

Così come il DNA antico, anche il DNA moderno può essere molto utile per avere una carta di identità dell'esemplare analizzato e per avere informazioni sulla sua popolazione ed eventualmente per mettere in atto strategie di conservazione laddove siano organismi protetti e/o in via di estinzione.

Sono stati isolati diciannove loci microsatelliti dal genoma della foca monaca mediterranea e sono stati analizzati i pattern genetici di due subpopolazioni ancora esistenti nel Nord Atlantico cioè quella di Cabo Blanco e Madeira

(Dayon et al. 2020). Quattro loci deviano dall'equilibrio di Hardy – Weinberg e sei loci mostrano un eccesso di omozigosi, suggerendo che sono in gioco sia le condizioni di non-equilibrio (basso numero di individui, popolazione che ha subito un collo di bottiglia ed è soggetta all'inbreeding) sia le condizioni degli alleli nulli (Dayon et al. 2020). Non è stato rilevato alcuno squilibrio di linkage tra coppie di loci (Dayon et al. 2020). La diversità genetica osservata nella popolazione è bassa (numero medio di alleli per locus = 2,68) ma superiore a quanto riportato in studi precedenti che utilizzavano l'amplificazione incrociata tra specie per la stessa popolazione (Dayon et al. 2020). I livelli osservati di diversità genetica nella popolazione dopo il collasso ($N = 16$) erano leggermente inferiori rispetto alla popolazione prima del collasso ($AR = 2,14$ vs. $2,39$), ma la perdita di 10 alleli rari nella popolazione dopo il collasso probabilmente riflette il deleterio impatto della grande moria del 1997 (Dayon et al. 2020). Gli individui di Madeira ($N = 4$) analizzati sono completamente omozigoti ($AR = 1,11$) (Dayon et al. 2020). Sebbene siano geneticamente differenziati dalla subpopolazione di Cabo Blanco, la distribuzione allelica ha mostrato che quella di Madeira è una sottopopolazione geneticamente depauperata che deriva da quella di Cabo Blanco, suggerendo che eventuali traslocazioni di individui da Cabo Blanco a Madeira possono essere considerate benefiche (Dayon et al. 2020).

La valutazione accurata della diversità genetica in una specie in pericolo come la foca monaca mediterranea è fondamentale per determinarne la struttura genetica, gli eventi demografici all'origine della sua bassa diversità e, infine, per pianificare future strategie di conservazione (Dayon et al. 2020).

1.4 Minacce

Fin dalla preistoria la foca monaca mediterranea è stata cacciata dall'uomo (Stringer et al. 2008, Morales-Pérez et al. 2019) anche se un intenso sfruttamento si è verificato probabilmente in epoca romana e medievale, quando le foche monache erano ampiamente cacciate per la loro pelle, olio e carne (Johnson 2004, Johnson e Lavigne 1999). La pesca è ancora la principale causa di morte delle foche monache del Mediterraneo in quanto molte di esse, ritenute responsabili di un impatto negativo sulle attività di pesca, vengono intenzionalmente uccise dai pescatori (Androukaki et al. 1999) o rimangono accidentalmente impigliate nelle reti da pesca (bycatch) (Karamanlidis et al. 2008). Inoltre, il degrado dell'habitat costiero e l'aumento del turismo hanno ridotto le aree continentali disponibili per il riposo e la prole, mettendo a rischio la capacità riproduttiva della specie (Karamanlidis et al. 2016a). Nel 1997 un evento di mortalità di massa è stato documentato a Cabo Blanco evidenziando il fatto che, insieme ad altri eventi stocastici (Karamanlidis et al. 2016a) virus e fioriture algali tossiche (Osterhaus et al. 1998, Reyero et al. 1999) potrebbero anche essere importanti minacce aggiuntive alla sopravvivenza della foca monaca.

Le ragioni principali del recente e drammatico calo della popolazione includono l'aumento della pressione antropica che induce le foche a spostarsi

dal loro habitat, la distruzione/alterazione dell'habitat adatto, la mortalità continua a causa dell'uccisione deliberata da parte dei pescatori, il bycatch e una moria di massa nella colonia di Cabo Blanco (Karamanlidis et al. 2016a). Potenzialmente, anche la limitata disponibilità di fonti alimentari, la consanguineità genetica e l'inquinamento potrebbero costituire una minaccia per la sopravvivenza della foca monaca mediterranea (Dendrinis et al. 2017). Il deterioramento, la distruzione e la frammentazione dell'habitat hanno giocato un ruolo importante nella già difficile situazione di questo animale. Un tempo abitante della spiaggia aperta, la specie è stata perseguitata dall'uomo per secoli ed è stata quindi costretta ad occupare habitat sempre più marginali (Dendrinis et al. 2017)

Il processo graduale dall'occupazione delle spiagge aperte all'utilizzo sempre più crescente di habitat marginali (cioè grotte marine più piccole e meno idonee) è stato accuratamente documentato (Johnson e Lavigne 1999). Questa minaccia è ancora ben presente oggi, in particolare nel Mediterraneo orientale (Kıraç et al. 2013). Gli habitat fondamentali della foca monaca del Mediterraneo sono stati colpiti da un aumento delle attività turistiche in tutta la Turchia, anche nelle aree protette come il Parco Nazionale Olympos Beydagları e l'Area Protetta Speciale di Kaş-Kekova. In queste zone turisti e subacquei frequentano spesso importanti siti di rifugio per le foche. Anche se questi

animali continuano a riposarsi in queste aree (sebbene in maniera minore), non sono stati registrati di recente parti e allattamenti in queste grotte (Gücü et al. 2009). Con l'aumento della popolazione umana e delle attività costiere intorno al Mediterraneo, crescono anche le potenziali minacce per l'habitat della specie (Dendrinou et al. 2007).

Le interazioni con la pesca sono di grande preoccupazione per la conservazione (Güçlüsoy e Savaş 2003a, Güçlüsoy 2008, Karamanlidis et al. 2008, Hale et al. 2011, González e Fernandez de

Larinoa 2012). L'uccisione deliberata di foche monache del Mediterraneo principalmente da parte dei pescatori è stata responsabile di un terzo dei 79 decessi studiati in Grecia tra il 1991 e il 1995 ed è considerata la più importante causa di mortalità per questa specie nel Mediterraneo orientale (Androukaki et al. 1999).



Fig. 11 – *L'ultima foca monaca mediterranea uccisa alle Isole Baleari. Una "guardia civil" (equivalente a un carabiniere italiano) le ha sparato con la sua arma da fuoco nell' aprile del 1958 a Cala Tuent, nella costa settentrionale di Mallorca. (© Gruppo Foca Monaca)*



Fig. 12 – *Una foca monaca mediterranea uccisa deliberatamente con una fiocina ad Alonissos (Grecia) nel luglio 2021*

La foca monaca del Mediterraneo resta spesso impigliata in un'ampia varietà di attrezzi da pesca, tra cui reti da posta, reti da traino e palangari (Johnson e Karamanlidis 2000) e l'entanglement rimane una delle principali fonti di mortalità nel Mar Mediterraneo orientale, soprattutto per gli animali subadulti (Karamanlidis et al. 2008, Kiraç et al. 2013).



Fig. 13 – Una foca monaca mediterranea trovata morta in una rete il 25 marzo 2012 vicino l'isola di El Elba in Libia

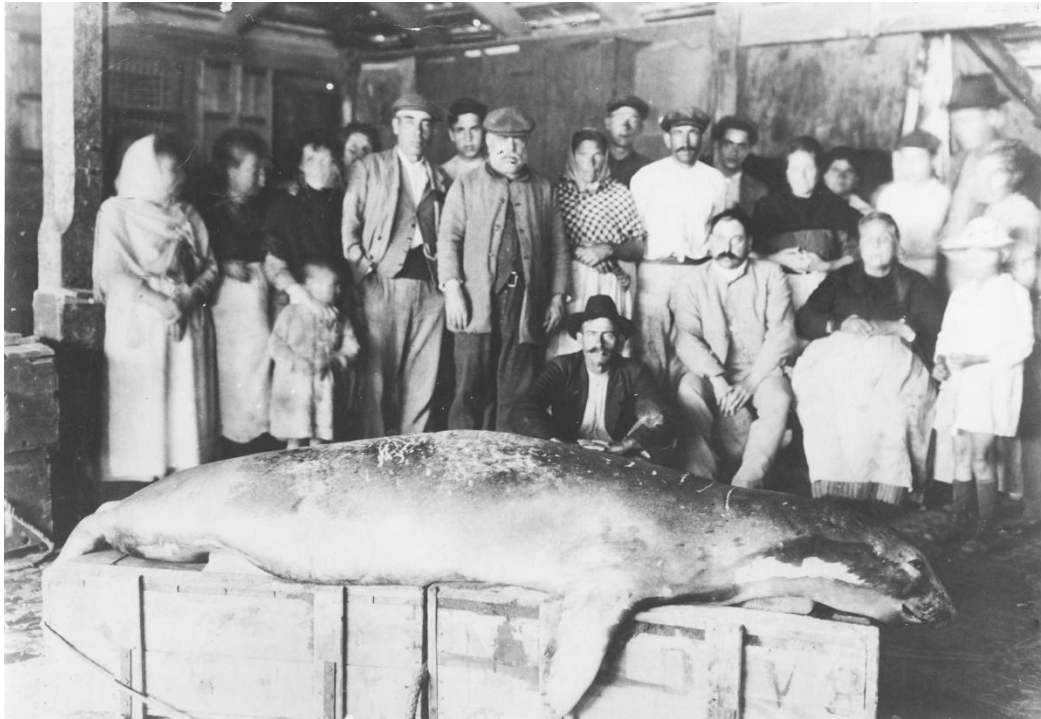


Fig. 14 – *Foca monaca mediterranea* catturata con un attrezzo chiamato "almadraba", usato per la pesca del tonno, a Cala Fornells, nella parte sud-occidentale dell'isola di Mallorca, nel maggio di 1922. Il corpo è stato trasportato con un autocarro a Palma, dove è stato esposto come curiosità. (© Gruppo Foca Monaca)

Anche le interazioni con le attività di pesca sono considerate fra le probabili cause della mancata ripresa della popolazione di Cabo Blanco poiché, anche se è cessata la pesca commerciale legale nella regione, attualmente la pesca illegale industriale e artigianale sembra essere fra le principali minacce alla sopravvivenza della colonia, principalmente per le foche subadulte (González e Fernandez de Larrinoa 2012). In confronto, l'effetto delle interazioni negative tra le foche e la pesca nell'arcipelago di Madeira è considerato inferiore. Trappole, ciancioli e reti da posta usate illegalmente sono i principali attrezzi

da pesca che rappresentano una minaccia per le specie nella regione (Hale et al. 2011). Nel sud della Turchia, un'importante colonia di foche monache è quasi scomparsa negli anni '90, quando la pesca industriale nell'area ha ridotto le risorse ittiche disponibili e sono aumentate le interazioni negative dei pescatori artigianali con le foche monache (cioè uccisioni volontarie). Tuttavia, una serie di regolamenti applicati per proteggere le specie ittiche ha alleviato i problemi e ha aiutato la popolazione locale di foche monache a riprendere l'attività riproduttiva nell'area (Gücü et al. 2004).

Dopo la mortalità di massa avvenuta a Cabo Blanco nel 1997, è stato isolato un ceppo di morbillivirus dalle foche morte. Questo ceppo virale assomigliava molto al morbillivirus dei delfini che era stato il responsabile nel 1991 di una moria di massa di stenelle striate (*Stenella coeruleoalba*, Meyen 1833) nel Mar Mediterraneo (Osterhaus et al. 1992, van de Bildt et al. 1999). Tuttavia, sebbene questo virus circolasse già nelle foche monache del Mediterraneo prima della mortalità di massa, vi sono dubbi sul fatto che sia stato responsabile delle morti avvenute. Infatti, il virus attivo è stato trovato nei cuccioli che sono andati in un centro di riabilitazione perché le loro madri erano morte, e nessuno di loro ha mostrato segni clinici e tutti sono sopravvissuti al virus senza un trattamento specifico.

Le saxitossine prodotte dalle dinoflagellate sono state trovate nei tessuti di

animali morti durante la mortalità di massa e la morte improvvisa degli animali e i sintomi clinici generali suggeriscono che la causa della morte sia dovuta proprio a queste tossine algali (Hernández et al. 1998).

Le fioriture algali tossiche (cioè le maree rosse) sono favorite dalle condizioni oceanografiche vicino a Cabo Blanco e sono state segnalate dal vicino Marocco durante un periodo di 25 anni che ha portato alla mortalità di massa. Le fioriture algali tossiche sono imprevedibili e in seguito alla catastrofica perdita di foche monache del Mediterraneo nel 1997 devono essere considerate una seria minaccia per le specie nella regione (Reyero et al. 2000, UNEP 2005).

I contaminati sono sempre stati sospettati di essere una minaccia per la foca monaca mediterranea e quindi il monitoraggio degli inquinanti è stato considerato un'elevata priorità di conservazione (Reijnders et al. 1993).

Tuttavia, le informazioni sono disponibili solo sugli inquinanti organoclorurati e sui metalli pesanti. Gli inquinanti organoclorurati sono stati analizzati negli anni '90 nelle sottopopolazioni di Cabo Blanco e del Mediterraneo orientale: i livelli di residui sono risultati molto bassi nella prima sottopopolazione e da moderati ad alti nella seconda (Yediler et al. 1993, Borrell et al. 1997, Borrell et al. 2007). Recenti ricerche nel Mediterraneo orientale indicano che le foche monache in Grecia

non sono gravemente minacciate dai metalli pesanti, ma che questa minaccia

dovrebbe essere attentamente monitorata (Formigaro et al. 2016). Le foche monache del Mediterraneo sono a un livello di rischio sconosciuto ma si pensa che esso sia alto a causa di incidenti dovuti alle petroliere e/o ad altre navi e fuoriuscite di petrolio. Ciò deriva da un aumento del traffico navale e da una maggiore possibilità di incidenti, fuoriuscite e collisioni vicino a habitat importanti. Nel recente passato si sono verificati quattro incidenti o fuoriuscite di petrolio in prossimità di importanti habitat della foca monaca (Israëls 1992, Kiraç 1998, UNEP 2005). Nessuno di questi sversamenti o incidenti ha avuto un impatto noto sulle foche monache, ma evidenziano la minaccia di un grave incidente marittimo vicino a un importante sito di foche monache (UNEP 2005).

Sebbene non siano disponibili informazioni sufficienti per valutare in modo preciso l'entità della disponibilità limitata di fonti alimentari, della consanguineità genetica e dell'inquinamento come minacce per la foca monaca mediterranea, non vi è alcuna indicazione che al momento stiano influenzando in modo significativo la foca monaca mediterranea (Karamanlidis et al. 2016a). L'arrivo di pesci lessepsiani nel Mar Mediterraneo orientale, come il pesce palla argenteo (*Lagocephalus sceleratus*, Gmelin 1789), potrebbe avere un impatto negativo anche sulle foche monache mediterranee nella regione dato che questo pesce può essere consumato come preda ma è altamente velenoso,

le sue carni infatti contengono la tetrodotossina, una potente neurotossina. Lo stesso vale per il cambiamento climatico che, con il conseguente innalzamento del livello del mare, potrebbe avere anche un impatto negativo, di entità sconosciuta, sull'habitat della foca monaca mediterranea, andando a sommergere le grotte usate dalle foche per i parti e gli allattamenti. Ulteriori rischi per la specie derivano dalla sfida di attuare misure di conservazione efficaci per una specie in un ambiente complesso e che riguarda più Paesi e dalla debole applicazione di accordi e leggi internazionali (Aguilar 1999).

1.5 Conservazione

Al giorno d'oggi la foca monaca del Mediterraneo è legalmente tutelata in tutto il suo areale attraverso legislazioni nazionali, convenzioni regionali e internazionali, nonché regolamenti dell'Unione Europea. Secondo la Direttiva del Consiglio Europeo 92/43EEC, la foca monaca mediterranea è considerata una specie di importanza comunitaria (Dendrinis et al. 2017).

Misure e regolamenti appositamente progettati per la protezione di importanti popolazioni di foca monaca del Mediterraneo sono attualmente presenti nelle seguenti aree: la Riserva Naturale delle Isole Desertas nell'Arcipelago di Madeira, il Parco Nazionale Marino di Alonissos nelle Sporadi settentrionali, l'area marina protetta del Nord Karpathos–Saria e la no-take-zone di tre miglia nell'isola di Gyros in Grecia. Con la stessa logica e al fine di proteggere la popolazione della foca monaca e le grotte dove partorisce e allatta, sono state create un'area di divieto di pesca e una riserva nella penisola di Cabo Blanco (Dendrinis et al. 2017).

In Turchia, misure simili sono state messe in atto in cinque località costiere del paese: Foça, Karaburun, Alaçatı-Sigacik, la penisola di Bodrum e la costa della Cilicia (Dendrinis et al. 2017).

Infine, la specie è esplicitamente menzionata in 102 siti Natura 2000 all'interno dell'Unione Europea (82 siti in Grecia, 10 in Italia, cinque in Spagna, tre in

Portogallo e due a Cipro) (Karamanlidis et al. 2016a).

In base alla legislazione europea, i siti Natura 2000 sono legalmente considerati dagli Stati membri dell'UE come Aree Protette e all'interno dei loro confini dovrebbero essere attuate azioni di gestione appropriate (Dendrinis et al. 2017).

Negli ultimi due decenni e in tutto l'areale della specie, è stata intrapresa un'azione diffusa per la conservazione della foca monaca mediterranea. In particolare, nelle aree in cui vivono e si riproducono importanti popolazioni di foche monache (vale a dire Grecia, Turchia, Arcipelago di Madeira e Cabo Blanco), sono state realizzate iniziative a lungo termine per sensibilizzare la popolazione umana locale alla conservazione della foca monaca, per proteggere i siti dove crescono i cuccioli, per limitare l'uso degli attrezzi da pesca e rivedere le pratiche di pesca più avverse, per sviluppare programmi di monitoraggio e protocolli di intervento e per aumentare la capacità in loco di riabilitare individui malati e feriti, in particolare i cuccioli (Dendrinis et al. 2017). Inoltre, molti workshop e conferenze hanno riunito scienziati e manager per discutere questioni e problemi relativi alla conservazione della foca monaca del Mediterraneo. Ancora, numerosi organismi e forum internazionali, tra cui il Centro di attività regionale per le aree di protezione speciale e la Commissione generale della pesca per il Mediterraneo, hanno avanzato iniziative e proposte

per migliorare le minacce esistenti e mitigare le pressioni dei settori interessati (ad esempio, pesca, catture accessorie, ecc.). In Grecia, il “Piano d'azione e strategia nazionale per la conservazione della foca monaca mediterranea in Grecia, 2009–2015” ha descritto in dettaglio le azioni che dovevano essere realizzate nel paese entro il 2015 per salvaguardare il futuro della specie (Notarbartolo di Sciara et al. 2009). Allo stesso modo, in Turchia il Comitato nazionale della foca monaca ha redatto un “Piano d'azione nazionale per la conservazione della foca monaca mediterranea *Monachus monachus* in Turchia” che è stato approvato dal Ministero turco per le opere forestali e idriche (Kıraç et al. 2013). Recentemente è stata adottata anche dalle parti del Programma delle Nazioni Unite per l'ambiente (Notarbartolo di Sciara 2013) una nuova Strategia regionale per la conservazione della foca monaca del Mediterraneo (Notarbartolo di Sciara et al. 2013) Analogamente, è stato adottato un Piano d'azione per il recupero della foca monaca mediterranea nell'Atlantico orientale (UNEP 2005). Sembra che le azioni di gestione e protezione finora svolte abbiano avuto effetti positivi sulla foca monaca mediterranea, sia nel Mediterraneo orientale che nell'Atlantico. In entrambe le aree le popolazioni della specie stanno mostrando ora incoraggianti segnali di ripresa, facendo ben sperare per il futuro della specie. Un riflesso di quanto sopra, insieme ad altri fattori, è il recente passaggio della foca monaca

mediterranea da specie “in pericolo critico” a specie “in pericolo” nell’elenco della IUCN (Karamanlidis e Dendrinis 2015). Naturalmente, questo cambiamento nella lista della IUCN non è una garanzia per il futuro della specie, poiché le popolazioni che rimangono sono ancora di dimensioni molto ridotte, mentre tutte le minacce descritte in precedenza sono ancora in atto (Dendrinis et al. 2017). La cancellazione dall'elenco rileva semplicemente che ci si sta muovendo nella giusta direzione (Dendrinis et al. 2017). Sforzi sistematici per gestire e proteggere la specie in modo corretto ed efficiente sono ovviamente ancora necessari al fine di garantire il futuro della specie (Dendrinis et al. 2017).

Un’azione fondamentale è sicuramente la sensibilizzazione della popolazione, in particolare dei pescatori che possono risultare la categoria più colpita da eventuali danni che la foca monaca può causare alle reti. Bisogna far capire ai pescatori che questo animale non è pericoloso per i loro interessi, aiutati anche dalle istituzioni e dalle amministrazioni che dovrebbero rimborsare eventuali danni. Solo in questo modo, creando una rete collaborativa, si può raggiungere lo scopo finale che è la conservazione della foca monaca mediterranea.

1.6 Citizen science

Il termine “*Citizen science*” si riferisce ai volontari che partecipano come assistenti sul campo a studi scientifici (Cohn 2008). I cittadini aiutano a monitorare animali e piante selvatiche o altri indicatori ambientali, ma non sono pagati per la loro assistenza, né sono necessariamente scienziati (Cohn 2008). La maggior parte sono dilettanti che si offrono volontari per assistere la ricerca ecologica perché amano la vita all'aria aperta o sono preoccupati per le tendenze e i problemi ambientali e vogliono fare qualcosa al riguardo (Cohn 2008). In genere, i volontari non analizzano dati o scrivono articoli scientifici, ma sono essenziali per raccogliere le informazioni su cui si basano gli studi (Cohn 2008). Le collaborazioni tra scienziati e volontari hanno il potenziale per ampliare l'ambito della ricerca e migliorare la capacità di raccogliere dati scientifici (Cohn 2008). I membri del pubblico interessati possono contribuire con preziose informazioni man mano che imparano a conoscere la fauna selvatica nelle loro comunità locali (Cohn 2008).

La Citizen science applicata all'ambiente marino rappresenta una strada promettente per migliorare l'impegno nella conservazione marina in tutto il mondo (Kelly et al. 2020).

Può anche migliorare l'alfabetizzazione scientifica pubblica attraverso l'apprendimento dei partecipanti (Crall et al. 2012, Turrini et al. 2018) e la

condivisione della conoscenza tra reti sociali più ampie (Nursey-Bray et al. 2018). La partecipazione alla Citizen science in ambiente marino consente alle comunità di avere una maggiore consapevolezza sullo “stato di salute” degli oceani e informarsi su questioni quali la redistribuzione delle specie marine (Pecl et al. 2019), la raccolta dei frutti di mare (Warner et al. 2019), l'inquinamento da plastica (Zettler et al. 2017), la conservazione dei cetacei (Matear et al. 2019) e la pianificazione ambientale marina (Jarvis et al. 2015). Inoltre, gli sforzi della Citizen science basati sulla comunità possono consentire un'implementazione più rapida dei risultati della ricerca nelle politiche e nella gestione (Danielsen et al. 2010). Nell'ultimo decennio si sono verificati progressi significativi nella Citizen science che hanno consentito ai progetti di estendersi dal fondo dell'oceano alla Via Lattea e di coprire quasi tutto il resto (Earp e Liconti 2020). Questi progetti hanno fornito mezzi convenienti per raccogliere grandi quantità di dati che coprono vaste scale spazio-temporali e che possono essere utilizzati nella ricerca scientifica, per sviluppare politiche di conservazione e per promuovere la consapevolezza ambientale (Earp e Liconti 2020).

La Citizen science, spesso descritta come partecipazione amatoriale alla ricerca scientifica e al monitoraggio, è emersa come uno strumento potente e un'attività popolare negli ultimi decenni (Cohn 2008, Kullenberg e Kasperowski 2016,

Burgess et al. 2017).

Tuttavia, questo fenomeno non è nuovo e risale a prima della professionalizzazione della scienza, per cui la maggior parte degli "scienziati", tra cui Benjamin Franklin (1706-1790), Charles Darwin (1809-1888) e Margaret Gatty (1809-1873) si guadagnavano da vivere in diverse professioni (Silvertown 2009).

Eppure, nonostante l'evoluzione della scienza come professione retribuita alla fine del XIX secolo, i "dilettanti" sono rimasti coinvolti in molte discipline scientifiche come l'archeologia, l'astronomia, la meteorologia e la storia naturale (Silvertown 2009, Haklay 2015).

Sebbene non siano così prevalenti come le loro controparti terrestri (Roy et al. 2012, Cigliano et al. 2015, Theobald et al. 2015, Garcia-Soto et al. 2017), i progetti di Citizen science in campo marino sono comunque molto utili per avere informazioni sugli organismi marini (Earp e Liconti 2020).

Capitolo secondo

MATERIALI E METODI

2.1 DNA antico

2.1.1 Campionamento

In questo lavoro di tesi sono state effettuate le analisi genetiche su un totale di 11 individui di foca monaca mediterranea provenienti dal Mar Mediterraneo occidentale. Dieci campioni sono stati prelevati da reperti museali e un campione da un individuo spiaggiatosi nel gennaio del 2020 sulle coste italiane. Per quanto riguarda il DNA antico (che verrà trattato in questa prima parte) sono stati analizzati denti, peli, tessuto epidermico e ossa di questa specie di pinnipede. Laddove possibile sono stati prelevati i denti poiché lo smalto riesce a proteggere meglio il DNA contenuto nella polpa del dente. Tra i tessuti mineralizzati infatti, l'osso compatto e la dentina di solito forniscono il "migliore" DNA antico in termini di lunghezza del frammento, quantità e modificazioni chimiche (Adler et al. 2011, Higgins et al. 2013, Gilbert et al. 2003).

Sia i denti che i tessuti sono stati prelevati da aree del corpo quasi invisibili agli occhi dei visitatori del museo, questo per non rovinare l'esemplare imbalsamato. L'unico tessuto osseo analizzato proviene da un esemplare

ritrovato nella Grotta delle Felci presso l'isola di Capri e risalente a circa 6000 anni fa. Gli altri reperti museali risalgono quasi tutti alla metà del XX secolo e il più recente è datato 1967. In questa fase di campionamento sono state molto utili le istituzioni museali che conservano i reperti di foca monaca analizzati quali il Museo "Ignazio Cerio" di Capri, il Museo Zoologico dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", la Collezione Naturalistica dell'Istituto Pitagora di Bari, il Museo Talassografico "Attilio Cerruti" di Taranto (Fig. 15), il Museo di Zoologia "Pietro Doderlein" di Palermo, il Museo Civico di Storia Naturale di Comiso (RG), l'Università del Salento con il suo Museo di Biologia Marina "Pietro Parenzan" di Porto Cesareo (LE) e il Museo di Zoologia dell'Università degli Studi di Cagliari.



Fig. 15 – *Esemplare esposto al Museo Talassografico di Taranto da cui è stato prelevato il campione MmTA*

Il campione proveniente da Capri e denominato MmCA è stato sottoposto a datazione con il metodo del radiocarbonio mediante la tecnica della spettrometria di massa ad alta risoluzione (AMS), presso il Centro di Datazione e Diagnostica (CEDAD) dell'Università del Salento. I macrocontaminanti presenti nel campione sono stati individuati mediante osservazione al microscopio ottico e rimossi meccanicamente. Il trattamento chimico di rimozione delle contaminazioni dal campione è stato effettuato sottoponendo il

materiale selezionato ad attacchi chimici alternati acido-alcalino-acido. Il materiale estratto è stato successivamente convertito in anidride carbonica mediante combustione a 900°C in ambiente ossidante, e quindi in grafite mediante riduzione. Si è utilizzato H₂ come elemento riducente e polvere di ferro come catalizzatore. La quantità di grafite estratta dal campione è risultata sufficiente per una accurata determinazione sperimentale dell'età. La concentrazione di radiocarbonio è stata determinata confrontando i valori misurati delle correnti di ¹²C e ¹³C, e i conteggi di ¹⁴C con i valori ottenuti da campioni standard di Saccarosio C6 forniti dalla IAEA. La datazione convenzionale al radiocarbonio è stata corretta per gli effetti di frazionamento isotopico sia mediante la misura del termine δ13C effettuata direttamente con l'acceleratore, sia per il fondo della misura.

Campioni di concentrazione nota di Acido Ossalico forniti dalla NIST (National Institute of Standard and Technology) sono stati utilizzati come controllo della qualità dei risultati.

Per lo studio del DNA antico si lavora un campione per volta separando fisicamente il luogo dove si estrae il DNA dal luogo in cui avviene la PCR e, una volta che il campione ha raggiunto il laboratorio dove avviene la PCR, non può tornare nel laboratorio di estrazione, per evitare contaminazioni e anche il personale stesso non può compiere questo passaggio.

Le fasi da seguire per lo studio del DNA antico sono le seguenti e verranno poi descritte nei paragrafi successivi:

- 1) Campionamento
- 2) Decontaminazione del campione
- 3) Estrazione del DNA
- 4) Reazione a catena della polimerasi (PCR)
- 5) Sequenziamento Sanger
- 6) Allineamento con BLAST e ClustalW
- 7) Costruzione del network aplo-tipico

cod Genetica	mtDNA Hap	Tipo Campione	Museo	Provenienza	Anno
MmCA	NO	Osso (Omero)	Museo "Ignazio Cerio" (Capri)	Grotta delle Felci (Capri)	4000 a.C. circa
Mm1_Zch223	Mm01	Dente di adulto	Museo Zoologico dell'Università degli Studi di Napoli Federico II (Napoli)	Golfo di Napoli	ca. 1890
MmBA	Mm01	Tessuto e Peli	Istituto Pitagora (Bari), Collezione Naturalistica	Isola d'Elba	metà XX sec
MmTA	NO	Tessuto e Peli	Museo Talassografico "Attilio Cerruti" (Taranto)	Grotta della Zinzulusa (Castro Marina)	1965
MmPA	NO	Tessuto e Peli	Museo di Zoologia "Pietro Doderlein" (Palermo)	Sicilia	metà XX sec
MmSG	Mm01	Dente	Museo di Zoologia "Pietro Doderlein" (Palermo)	Sardegna	metà XX sec
Mm1150	Mm01	Dente	Museo di Zoologia "Pietro Doderlein" (Palermo)	Sicilia	metà XX sec
MmRG	NO	Dente 12 Sup. DX	Museo Civico di Storia Naturale (Comiso, RG)	Sicilia	metà XX sec
MmMR	NO	Tessuto e Peli	Università del Salento - Museo di Biologia Marina "Pietro Parenzan" (Porto Cesareo, LE)	Marocco Spagnolo	1967
MmSB	NO	Tessuto e Peli	Museo di Zoologia dell'Università degli Studi di Cagliari (Cagliari)	Sardegna	metà XX sec

Tab. 3 - Tabella con i campioni analizzati per il DNA antico e loro provenienza



Fig. 16 - *Mappa con la provenienza dei campioni analizzati per il DNA antico*



Fig. 17 – *Il campione MmZch223*



Fig. 18 – *Il campione MmBA*

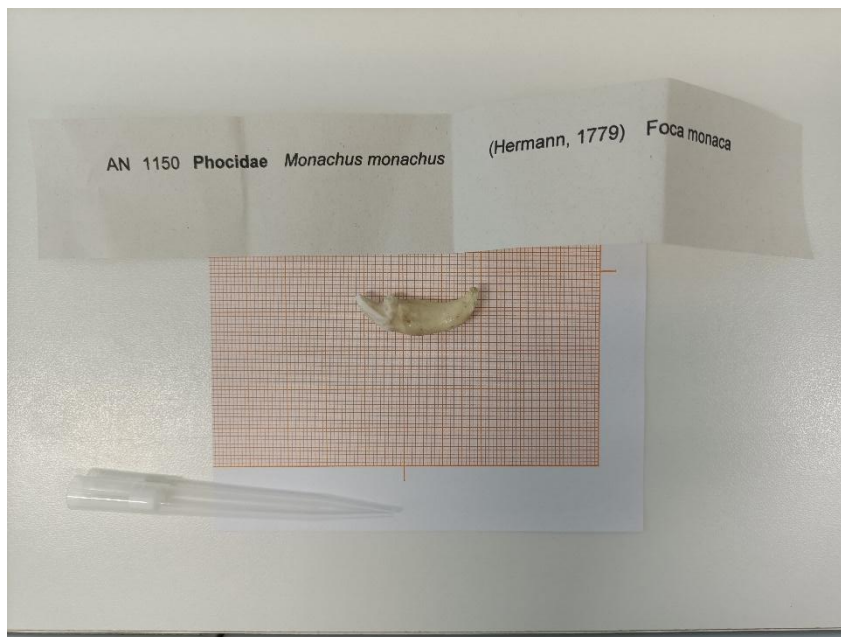


Fig. 19 – *Il campione Mm1150*

2.1.2 Estrazione del DNA

L'estrazione degli acidi nucleici, indipendentemente dal protocollo utilizzato, prevede una serie di quattro fasi:

- 1) Lisi cellulare → è il primo passaggio per l'ottenimento degli acidi nucleici e prevede la degradazione meccanica e/o chimica dei tessuti. Questo processo avviene generalmente in una soluzione tampone (buffer) di solito contenente l'EDTA (acido etilendiamminotetracetico) e per la degradazione meccanica dei tessuti possono essere usati diversi mezzi come forbici, potter e pestelli. Nello specifico l'EDTA rimuove gli ioni magnesio (per chelazione) necessari per preservare la struttura globale dell'involucro cellulare e inoltre esercita un'azione inibente nei confronti degli enzimi che potrebbero degradare gli acidi nucleici (DNAasi che sono attivate in presenza di ioni magnesio). Al buffer di solito si aggiunge una aliquota di SDS (sodio dodecil solfato), un detergente necessario perché favorisce la lisi rimuovendo le molecole lipidiche della membrana cellulare. Prima di procedere con la fase di estrazione, il lisato è sottoposto all'azione di una proteinasi come la proteinasi K e in questo modo i polipeptidi vengono demoliti in unità più piccole che vengono poi rimosse meglio mediante l'utilizzo di solventi organici.

- 2) Estrazione → in questo passaggio avviene la separazione meccanica tra materiale proteico in soluzione, sali e acidi nucleici. Può essere effettuata con processi di sequestro degli acidi nucleici di tipo fisico o chimico (ossia il DNA è trattenuto da alcune sostanze e quest'ultimo si riesce a dividere dagli altri composti) e vengono usati solventi organici come fenolo e cloroformio o biglie magnetiche.
- 3) Precipitazione → gli acidi nucleici presenti nella porzione acquosa della soluzione trattata per via chimica o attaccati alle biglie magnetiche vengono precipitati e isolati dal resto della soluzione; di base si usano dei solventi organici (alcoli) e delle temperature basse che favoriscono il processo di precipitazione
- 4) Purificazione → il DNA estratto e precipitato viene separato attraverso centrifugazione dal resto della soluzione; questo processo comporta la formazione di un pellet di acidi nucleici sul fondo della provetta. Il pellet viene successivamente sottoposto a purificazione con una serie di lavaggi; questa procedura permette di eliminare potenziali molecole che possono rappresentare degli interferenti nelle reazioni successive in cui si dovrà usare il DNA estratto. Il DNA ottenuto viene poi eluito, cioè portato in soluzione, con un solvente che può essere acqua sterile ultrapura o tamponi sterili

Le analisi genetiche di questi campioni sono state effettuate in un laboratorio apposito differente dal laboratorio usato per le fasi post PCR. I laboratori sono collocati in due strutture differenti dell'Università Politecnica delle Marche per seguire al meglio raccomandazioni di isolamento necessarie per lavorare sul DNA antico. Nel laboratorio usato per l'estrazione del DNA e per la preparazione della PCR (area pre-PCR) non sono mai stati introdotti campioni di foca monaca mediterranea. Ogni campione è stato processato in giorni differenti. L'ambiente in cui vengono effettuate queste analisi con DNA antico deve essere il più sterile possibile e per questo motivo le superfici vengono pulite con candeggina e poi con etanolo mentre gli strumenti vengono puliti con DNA away, poi con etanolo e infine vengono messi sotto i raggi UV all'interno di una cappa per 25-30 min sia prima di iniziare le procedure nel laboratorio sia dopo aver finito. L'accesso a questo laboratorio è consentito solo al personale autorizzato e adeguatamente vestito infatti, durante le fasi di lavoro è necessario indossare tute, mascherine, guanti monouso e calzature apposite. Nel laboratorio è presente una cappa per l'estrazione del DNA e una cappa per preparare i campioni per la PCR, questo al fine di ridurre al minimo le contaminazioni tra le varie fasi di lavorazione del campione. L'estrazione è un processo molto critico e per individuare eventuali contaminazioni viene sempre allestito il bianco d'estrazione.

Per l'estrazione del DNA da denti e ossa è stato usato il protocollo sviluppato da Yang et al. (1998) con le modifiche apportate da Speller et al. (2005)

Dai campioni di denti o frammenti di osso sono stati rimossi gli strati esterni con la carta vetrata, dopodiché sono stati immersi nella candeggina pura per 5 min, trascorsi i 5 min è stata rimossa la candeggina e sono stati risciacquati per 3 volte con acqua sterile ultrapura per eliminare eventuali residui di candeggina. Una volta rimossa l'acqua i campioni sono esposti ai raggi UV per 30 min per ogni lato e infine sono stati fatti asciugare.

Terminata la fase di decontaminazione, si è proceduto con la fase di estrazione. Il campione è stato ridotto in polvere fine, la polvere è stata versata in una Falcon da 50 ml contenente 4 ml di Buffer di lisi (200 µl di SDS 10%, 100 µl di proteinasi K 10 mg/ml e portare a volume con EDTA 0,5 M pH 8). In seguito la polvere è stata incubata over night a 50°C in bagnetto termostatico con agitazione orbitale. Contemporaneamente ai campioni è stato allestito il bianco di estrazione seguendo gli stessi identici passaggi.

Terminata questa prima parte di estrazione si procede con la seconda.

Le Falcon vengono centrifugate a 3000 rpm per 10-15 sec per far precipitare l'eventuale materiale solido non disciolto, si trasferiscono 3 ml di sovrnatante nelle colonnine Amicon Ultra 15 30K (Merck millipore) e vanno centrifugate a 3000 rpm per 25-30 min fino a concentrare il DNA in un volume di 100-125

μl. Il trattenuto va recuperato e purificato utilizzando il kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Nello specifico, al trattenuto vanno addizionati 5 volumi di QIAquick PB Buffer (fino a un massimo di 750 μl), caricati nelle QIAquick column e il tutto va centrifugato a 13000 rpm per 60 min.

Dopo questa centrifugazione l'eluato va scartato, il DNA trattenuto nel filtro va lavato aggiungendo 750 μl di QIAquick PE Buffer e si eseguono due nuove centrifugazioni a 13000 rpm per 60 sec ciascuna per eliminare ogni residuo di PE Buffer. In seguito l'eluato va scartato, la colonnina va spostata su un tubo da 1,5 ml eliminando il tappo, nella colonnina vanno aggiunti 100 μl di acqua sterile ultrapura e il tutto va centrifugato a 13000 rpm per 60 sec per eluire il DNA. Infine la soluzione contenente il DNA va spostata in una nuova provetta da 1,5 ml e conservata a -20°C.

Per l'estrazione del DNA da peli e tessuti è stato usato il kit di estrazione del DNA: DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Il tessuto da analizzare è stato tagliato in piccoli pezzettini fino ad ottenere circa 25 mg da inserire in un tubo per la microcentrifuga da 1,5 ml e sono stati aggiunti 180 μl di Buffer ATL e 20 μl di Proteinasi K. Oltre a questi 20 μl di Proteinasi K sono stati aggiunti ulteriori 20 μl di Proteinasi K e 4 μl di DTT (Ditiotreitolo) seguendo le indicazioni di Gaubert et al. (2019). Il tutto va miscelato con il vortex e incubato a 56°C nel bagnetto termostatico fino alla lisi completa. Dopo l'incubazione i

campioni sono stati miscelati per 15 sec, sono stati aggiunti 200 μ l di Buffer AL, il tutto è stato nuovamente mescolato, è stato aggiunto etanolo puro per poi procedere con una vortexata finale. Il mix va poi pipettato in una colonnina DNeasy Mini inserita in una provetta da 2 ml, centrifugato a 8000 rpm per 1 min, va tolta la provetta contenente il liquido sul fondo e la colonnina va messa in una nuova provetta da 2 ml dove vanno aggiunti 500 μ l di Buffer AW1 e va centrifugato di nuovo il tutto a 8000 rpm. Come nel passaggio precedente la provetta contenente il liquido sul fondo va eliminata, la colonnina va messa in una nuova provetta da 2 ml, vanno aggiunti 500 μ l di Buffer AW2 e si centrifuga questa nuova provetta per 3 min a 14000 rpm. Ancora una volta si elimina la provetta con il liquido sul fondo e si trasferisce la colonnina in una nuova provetta da 2 ml. Infine si aggiungono 60 μ l di acqua sterile ultrapura per l'eluizione (Gaubert et al. 2019), si incuba per 1 min a temperatura ambiente e per ultimo si centrifuga per 1 min a 8000 rpm per poi conservare il DNA estratto a -20°C.

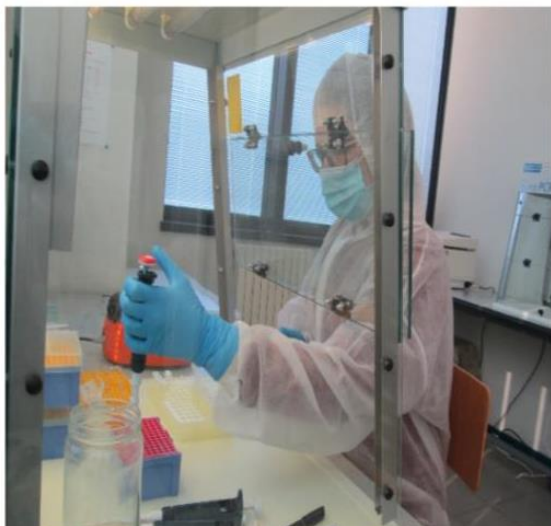


Fig. 20 – *Il lavoro in laboratorio viene svolto con dispositivi monouso per evitare il più possibile le contaminazioni*

2.1.3 Amplificazione

Per queste analisi sono state usate quattro coppie di primer precedentemente descritte nello studio di Karamanlidis et al. (2016b) e nello studio di Gaubert et al. (2019). (Tab. 2; Fig. 21).

È stata amplificata la regione ipervariabile I (HVRI) della regione di controllo del DNA mitocondriale dato che questo tratto di DNA ha i livelli più alti di diversità intraspecifica rispetto ad altre regioni del genoma mitocondriale (Karamanlidis et al. 2016b).

Nella miscela di reazione della PCR (reazione a catena della polimerasi) è stata inserita la BSA (albumina di siero bovino) per limitare il problema degli inibitori di PCR che possono essere eventualmente presenti sui reperti e che andrebbero ad influire negativamente sulla resa della reazione.

La BSA è stata inserita con concentrazioni diverse equivalenti a 0,1 mg/ml e 0,8 mg/ml.

La PCR è stata eseguita in 25 µl di volume contenenti 2,5 µl di Buffer per la PCR [10x], 0,75 µl di MgCl₂ [50mM], 0,2 µl di dNTP [10mM], 4,8 µl di Primer Forward + Reverse [5 µM], 0,2 µl di Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen™), 3 µl di DNA, 0,125 µl di BSA e 13,425 µl di acqua sterile ultrapura inserendo una concentrazione di BSA pari a 0,1 mg/ml.

Inserendo invece una concentrazione di BSA pari a 0,8 mg/ml la PCR è stata

eseguita in 25 µl di volume contenenti 2,5 µl di Buffer per la PCR [10x], 0,75 µl di MgCl₂ [50mM], 0,2 µl di dNTP [10mM], 4,8 µl di Primer Forward + Reverse [5mM], 0,2 µl di Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen™), 3 µl di DNA, 1µl di BSA e 12,55 µl di acqua sterile ultrapura.

In ogni provetta per la mix sono stati inseriti 35 µl di olio minerale per evitare evaporazione e contaminazioni durante la PCR.

Le coppie di primer presentano temperature di annealing differenti, infatti la coppia 1 e la coppia 4 hanno una temperatura di appaiamento rispettivamente di 57°C e 62°C mentre le coppie 2 e 3 hanno una temperatura di annealing pari a 55°C.

L'amplificazione di tutti i frammenti è stata effettuata all'interno di un termociclatore "T100™ Thermal Cycler" (Bio-Rad). Per le coppie 1 e 4 sono state impostate le seguenti condizioni: denaturazione iniziale per 7 min a 94°C seguita da 60 cicli di 20 sec a 94°C (denaturazione), 30 sec a 57°C la coppia 1 e 62°C la coppia 4 (appaiamento), 40 sec a 72°C (estensione) e infine una estensione finale di 7 min a 72°C.

Per le coppie 2 e 3 sono state impostate le seguenti condizioni: denaturazione iniziale per 7 min a 94°C seguita da 60 cicli di 20 sec a 94°C (denaturazione), 30 sec a 55°C (appaiamento), 40 sec a 72°C (estensione) e infine una estensione finale di 7 min a 72°C.

Per continuare a monitorare eventuali contaminazioni, nel termociclatore oltre alle provette contenenti i campioni e i bianchi di estrazione sono stati inseriti anche i bianchi di PCR, cioè provette contenenti tutti i componenti della mix di PCR ma al post dei 3 µl di DNA sono stati inseriti 3 µl di acqua sterile ultrapura. Per verificare l'efficacia della reazione di amplificazione e l'eventuale presenza di contaminazione rilevabile dai bianchi di estrazione e di PCR, i prodotti di PCR sono stati fatti correre su gel di agarosio al 2% contenente GelRed™ (Biotium) e, in seguito, gli amplificati di buona qualità sono stati spediti al laboratorio “BMR Genomics” di Padova per il sequenziamento Sanger. I campioni sono stati purificati usando il kit exoSAP-IT™ (Affymetrix Inc.) e sequenziati in entrambe le direzioni in un sequenziatore automatico ABIPRISM 3730XL (Applied Biosystems).

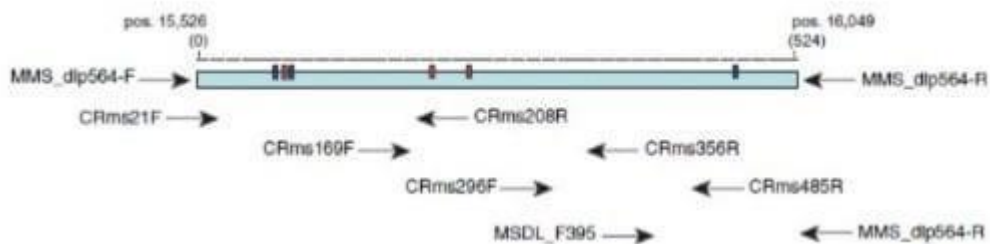


Fig. 21 – *Primer usati per amplificare la regione ipervariabile I della regione di controllo mitocondriale (Gaubert et al. 2019)*

2.1.4 Allineamento

Una volta ottenute le sequenze per ogni campione, queste sono state controllate sul programma BLAST (Altschul et al. 1990) per confermare l'appartenenza alla specie *Monachus monachus* e, per poter identificare l'aplotipo di appartenenza dei campioni esaminati in questo studio, sono state allineate su CLUSTALW (Larkin et al. 2007) insieme alle sequenze dei sette aplotipi precedentemente identificati per la specie (Karamanlidis et al. 2016b, Gaubert et al. 2019).

	SITI DIAGNOSTICI					
APLOTIPO	105	114	118	248	279	508
MM01	A	A	A	A	C	G
Mm1_Zch223
MmBA
MmSG
Mm1150
MM02	G
MM03	A
MM04	.	.	G	.	.	A
MM05	.	.	G	.	.	.
MM06	.	.	G	.	T	.
MM07	.	G	G	G	.	A

Tab. 4 - Siti diagnostici ottenuti dall'allineamento dei sette aplotipi della foca monaca mediterranea. Gli aplotipi appartenenti ai campioni analizzati sono evidenziati in fucsia mentre l'aplotipo a cui appartiene è evidenziato in giallo. L'aplotipo MM01 è stato utilizzato come sequenza di riferimento. Tutti i nucleotidi identici in altre sequenze sono indicati con dei punti.

2.1.5 Network aplotipico

L'allineamento ottenuto è stato controllato su BioEdit (Hall 1999) e successivamente utilizzato per la creazione di un median joining network (Bandelt et al. 1999) grazie al software Network 10 (Fluxus Technology Ltd., www.fluxus-engineering.com). Il network ha permesso di mettere in relazione gli aplotipi di appartenenza dei campioni analizzati in questo studio con gli aplotipi già descritti in studi precedenti (Karamanlidis et al. 2016b, Gaubert et al. 2019) e di chiarire la distribuzione degli aplotipi all'interno del Mar Mediterraneo.

2.2 DNA moderno

2.2.1 Campionamento

Il 27 gennaio 2020 è stato recuperato un cucciolo di *Monachus monachus* fortemente debilitato arenatosi sulla spiaggia di Torre San Gennaro e, nonostante i soccorsi, il giorno seguente è morto. Dopo la morte della foca monaca sono state effettuate alcune misurazioni ed è stata eseguita una necropsia dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata di Foggia, al fine di rivelare la possibile causa di morte dell'individuo. Durante questa procedura è stato prelevato un pezzo di tessuto muscolare e conservato in etanolo assoluto per poter poi effettuare le analisi genetiche per identificare l'origine geografica più probabile di questo esemplare di foca monaca.

La necropsia è stata effettuata dopo 12 ore dalla morte dell'animale e ha evidenziato un basso *body condition score*, sintomo di una debilitazione dell'organismo (Petrella et al. 2021).

Durante la necropsia sono state riscontrate cisti del protozoo *Toxoplasma gondii* nei polmoni, nel miocardio, nella tunica media della aorta e nei vasi sanguigni polmonari. Attraverso le analisi biomolecolari (Centelleghes et al. 2016, Beffagna et al. 2017) sono stati trovati frammenti genetici del morbillivirus dei cetacei (CeMV) nel cervello, nei polmoni e nella milza. È

stata riscontrata anche una positività biomolecolare per *Toxoplasma gondii* nei muscoli scheletrici e nei linfonodi.

Co-infezioni da morbillivirus e *Toxoplasma gondii* sono ben note tra i mammiferi acquatici e terrestri ma sono state raramente descritte nei pinnipedi (Petrella et al. 2021).



Fig. 22 – *Il cucciolo di foca sulla spiaggia di Torchiarolo (BR)*



Fig. 23 – *Il cucciolo di foca prima della necropsia*

2.2.2 Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto da una piccola fetta di tessuto muscolare utilizzando l'estrattore automatico di acidi nucleici, MagCore® HF16 (RBC Bioscience Corp., Taipei, Taiwan), con il kit di estrazione MagCore® Genomic DNA Tissue Kit (codice 401) (RBC Bioscience Corp., Taipei, Taiwan) seguendo le istruzioni del produttore. L'estrazione di questo DNA è avvenuta nel laboratorio di Biologia Evolutiva e Citogenetica che corrisponde all'area post PCR per l'analisi del DNA antico.

2.2.3 Amplificazione

Una volta avvenuta l'estrazione del DNA, è stata amplificata anche in questo caso la regione ipervariabile I (HVRI) della regione di controllo del DNA mitocondriale usando le coppie di primer disegnate da Karamalidis et al., 2016b.

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata eseguita in 25 µl di volume contenenti 5 µl di PrimeSTAR® GXL Polymerase Buffer [5X], 2 µl di dNTP [10 mM], 2 µl di Primer Forward + Reverse [5 µM], 0,8 µl di PrimeSTAR® GXL DNA Polimerase [1.25 U/µL] (Takara), 3 µl di DNA [40 ng/µl] e 1,2 µl di acqua sterile ultrapura. L'amplificazione è stata effettuata all'interno di un termociclatore "T100™ Thermal Cycler" (Bio-Rad) usando le seguenti condizioni: denaturazione iniziale per 5 min a 95°C seguita da 35 cicli di 30 sec a 95°C (denaturazione), 30 sec a 57°C (appaiamento), 60 sec a 72°C (estensione) e infine una estensione finale di 7 min a 72°C. Per verificare l'efficacia della reazione di amplificazione, il prodotto di PCR è stato fatto correre su un gel di agarosio al 2% contenente GelRed™ (Biotium) e l'amplificato ottenuto è stato poi spedito al laboratorio "BMR Genomics" di Padova per il sequenziamento Sanger. I campioni sono stati purificati usando exoSAP-IT™ (Affymetrix Inc.) e sequenziati in entrambe le direzioni in un sequenziatore automatico ABIPRISM 3730XL (Applied Biosystems).

2.2.4 Allineamento

Allo scopo di identificare l'aplotipo di appartenenza del campione esaminato in questo studio, la sequenza ottenuta mediante sequenziamento Sanger è stata allineata su CLUSTALW (Larkin et al. 2007) insieme alle sequenze dei sette aplotipi di *Monachus monachus* precedentemente identificati per la specie (Karamanlidis et al. 2016b, Gaubert et al. 2019). Successivamente l'allineamento è stato controllato su BioEdit (Hall 1999).

	SITI DIAGNOSTICI					
APLOTIPO	105	114	118	248	279	508
MM01	A	A	A	A	C	G
MM02	G
MM03	A
MMBR	A
MM04	.	.	G	.	.	A
MM05	.	.	G	.	.	.
MM06	.	G	.	.	T	.
MM07	.	G	G	G	.	A

Tab. 5 - Siti diagnostici ottenuti dall'allineamento dei sette aplotipi della foca monaca mediterranea. La sequenza dell'individuo analizzato è evidenziata in azzurro, corrispondente all'aplotipo MM03 (in verde). L'aplotipo MM01 è stato utilizzato come sequenza di riferimento. Tutti i nucleotidi identici in altre sequenze sono indicati con dei punti.

2.2.5 *Network aplotipico*

L'allineamento ottenuto è stato controllato su BioEdit (Hall 1999) e successivamente utilizzato per la creazione di un median joining network (Bandelt et al. 1999) grazie al software Network 10 (Fluxus Technology Ltd., www.fluxus-engineering.com). Il network ha permesso di mettere in relazione gli aplotipi di appartenenza dei campioni analizzati in questo studio con gli aplotipi già descritti in studi precedenti (Karamanlidis et al. 2016b, Gaubert et al. 2019). Inoltre, allo scopo di evidenziare l'origine geografica del cucciolo di foca monaca, sono state ottenute da studi precedenti informazioni sulla frequenza e sulla provenienza geografica di tutti gli aplotipi (Karamanlidis et al. 2016b, Gaubert et al. 2019) e queste informazioni sono state aggiunte durante la costruzione del network aplotipico.

2.3 Citizen science e avvistamenti di *Monachus monachus* in Italia

Grazie alla Citizen science e alle segnalazioni di tante persone come pescatori sportivi, pescatori di professione, subacquei o semplici cittadini che passeggiavano in riva al mare negli ultimi anni sono state raccolte numerose osservazioni di *Monachus monachus* in Italia.

Sebbene da oltre due decenni le popolazioni stanziali di foca monaca mediterranea sono scomparse dalle località italiane, sono comunque state riportate osservazioni dirette occasionali.

La foca monaca mediterranea era presente in tutta l'Italia continentale, in Sicilia, in Sardegna e nelle isole minori ma le popolazioni stanziali scomparvero dall'Italia continentale durante la metà dello scorso secolo mentre dalla Sicilia, dalla Sardegna e dalle isole minori italiane scomparvero tra la metà degli anni '70 e i primi anni '90 del 1900 (Aguilar 1999).

Per questa tesi ho effettuato delle ricerche online tramite social network e articoli di giornale per ricostruire gli avvistamenti di foca monaca lungo le coste italiane negli ultimi 20 anni. La ricerca eseguita da me tramite le segnalazioni online inizia dal 1998 per poter avere una linearità con il lavoro di Mo (2011) e arriva fino al 31 dicembre 2021.

Sono stati presi in considerazione articoli di giornale online e pagine Facebook dedicate alla foca monaca mediterranea o in generale alla fauna italiana dove

gli avvistamenti sono stati validati da persone esperte, questo perché nella maggior parte dei casi non si hanno foto e/o video a disposizione e le persone che riportano tali avvistamenti non sempre hanno un background scientifico che consente loro di discriminare se l'animale in questione è un Pinnipede o no. Ogni qualvolta veniva segnalato un nuovo avvistamento l'ho riportato in un file Excel annotando la data, il luogo, il numero di animali, se era presente o no una documentazione foto e/o video ed eventuali note come per esempio se si trattava di avvistamenti ripetuti. Una volta terminato il 2021, ho incrociato i dati raccolti da me con quelli dello studio di Mo (2011) e di Bundone (2016) per avere un quadro completo delle osservazioni raccolte dal 1998 al 2021. Laddove un dato raccolto da me corrispondeva ad un dato già raccolto precedentemente negli studi citati, l'attribuzione del dato viene assegnata a chi lo ha raccolto per primo.

Le osservazioni raccolte da me sono state fatte tutte da pescatori, subacquei o persone che si trovavano in riva al mare per una passeggiata. I dati raccolti sono stati elaborati sotto forma di tabelle e grafici (Capitolo 3, Paragrafo 3; Tab. 6; Fig. 29).



Fig. 24 – Una foca monaca mediterranea ripresa dalle videotrappole nella AMP delle Isole Egadi nel dicembre 2017 (© ISPRA / AMP Isole Egadi)



Fig. 25 – Una foca monaca mediterranea avvistata nel giugno 2009 all'Isola del Giglio (© Marco Prete)

Capitolo terzo

RISULTATI

3.1 DNA antico

Dopo aver estratto il DNA, amplificato i campioni tramite PCR e infine dopo il sequenziamento è stato possibile ricostruire un tratto dell'HVR1 della regione di controllo del mtDNA di quattro campioni su dieci. I campioni che hanno avuto successo sono Mm1_Zch223, MmBA, MmSG e Mm1150. Il campione Mm1_Zch223 proviene dal Golfo di Napoli, il campione MmBA proviene dall'Isola d'Elba, il campione MmSG proviene dalla Sardegna mentre il campione Mm1150 proviene dalla Sicilia. Tutti e quattro i campioni hanno mostrato una appartenenza all'aplotipo MM01, l'aplotipo più diffuso nel Mar Mediterraneo e in generale l'aplotipo più diffuso tra gli individui di foca monaca mediterranea. Invece, per i sei campioni restanti non è stato possibile ricostruire completamente la sequenza di nostro interesse a causa di problemi nell'amplificazione o nel sequenziamento di alcuni tratti.

Il confronto di tutte le sequenze ottenute con quelle presenti in GenBank eseguito con BLAST ha confermato l'identità della specie *Monachus monachus* per i quattro campioni con esito positivo.

Il campione proveniente dall'isola di Capri è stato uno dei campioni che ha dato

esito negativo, probabilmente a causa della sua età e del luogo in cui è stato ritrovato. Gli esami eseguiti con il carbonio₁₄ hanno permesso di datare l'osso a 6.005 ± 45 anni fa. Per la determinazione dell'errore sperimentale nella data al radiocarbonio è stato tenuto conto sia dello scattering dei dati intorno al valore medio, sia dell'errore statistico derivante dal conteggio del ¹⁴C. La datazione al radiocarbonio per i campioni è stata quindi calibrata in età di calendario utilizzando il software OxCal Ver. 3.10 basato sui dati marini (Reimer PJ, et al. 2009 Radiocarbon) e un termine di correzione per l'effetto marino di riserva pari a $\Delta R=58 \pm 15$ anni (valore medio per il Mar Mediterraneo). Secondo questa calibrazione il campione risale tra il 4519 e 4316 a.C.

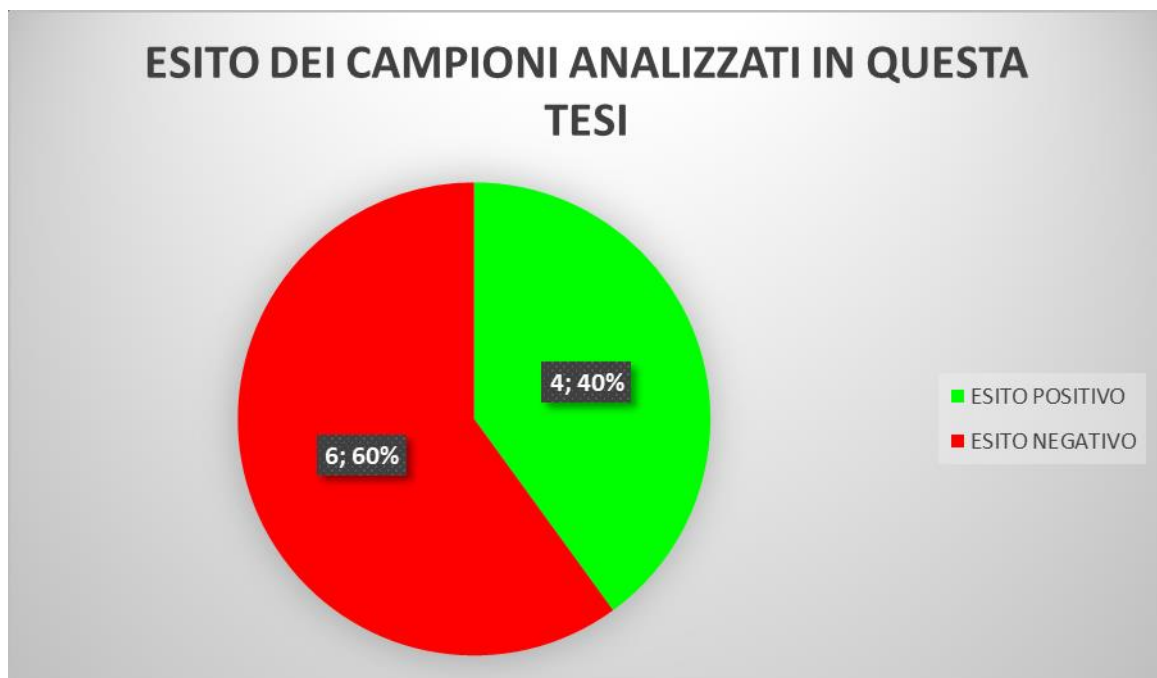
I quattro campioni che hanno avuto successo erano tre denti (Mm1_Zch223, MmSG e Mm1150) e epidermide con peli (MmBA) mentre i campioni che non hanno dato un risultato positivo erano un osso (MmCA, reperto dell'isola di Capri), quattro tessuti epiteliali più peli (MmTA, MmPA, MmRG, MmMR e MmSB) e un dente (MmRG). Questo dimostra ancora una volta come i denti ben conservati siano il materiale migliore per poter effettuare analisi genetiche sul DNA antico. I campioni con esito positivo risalgono alla metà del XX secolo (MmBA, MmSG e Mm1150) e al 1890 (Mm1_Zch223) mentre alcuni campioni con esito negativo sono della fine degli anni '60, facendo notare che

in questo caso l'età non ha influito sulla riuscita, quanto piuttosto la qualità del campione.

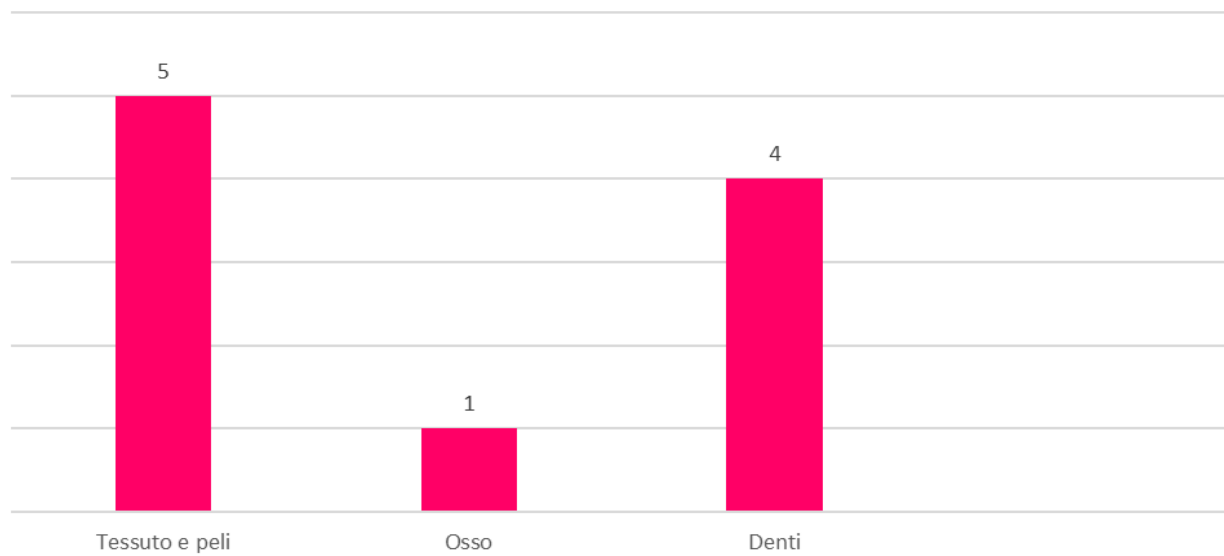
L'allineamento eseguito con CLUSTALW delle sequenze ottenute dai campioni storici con i sette aplotipi noti in letteratura a livello globale ha mostrato una corrispondenza con l'aplotipo MM01.

Il median joining network costruito mette in evidenza come questi campioni appartengano all'aplotipo più diffuso di foca monaca mediterranea.

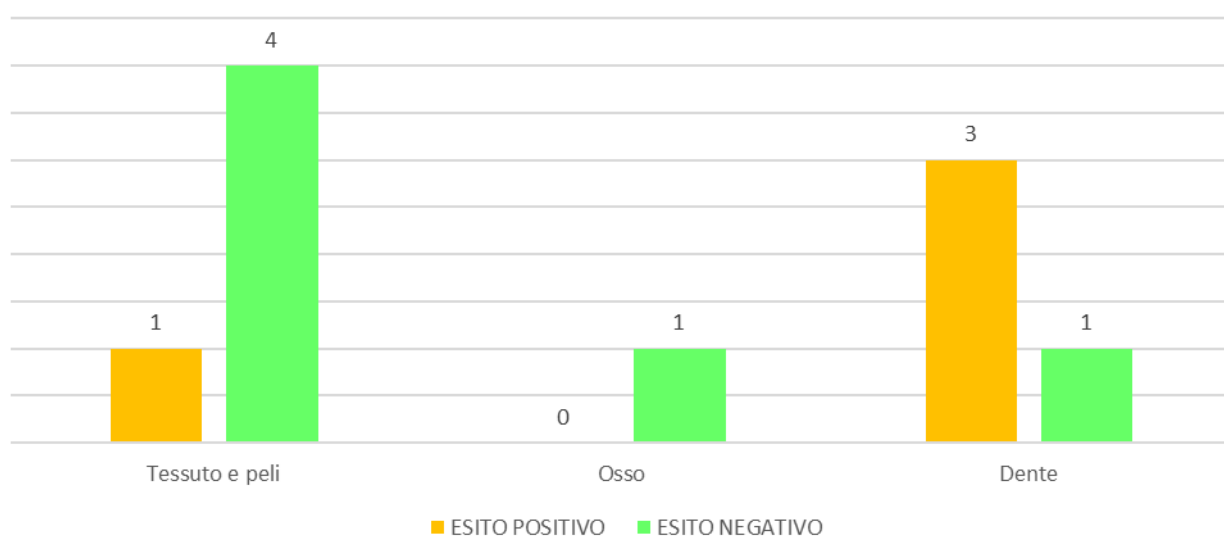
Fig. 26 – Grafici che illustrano la tipologia dei campioni analizzati e l'esito ottenuto



TIPOLOGIA DI TESSUTI ANALIZZATI



ESITO DEI CAMPIONI IN BASE ALLA TIPOLOGIA



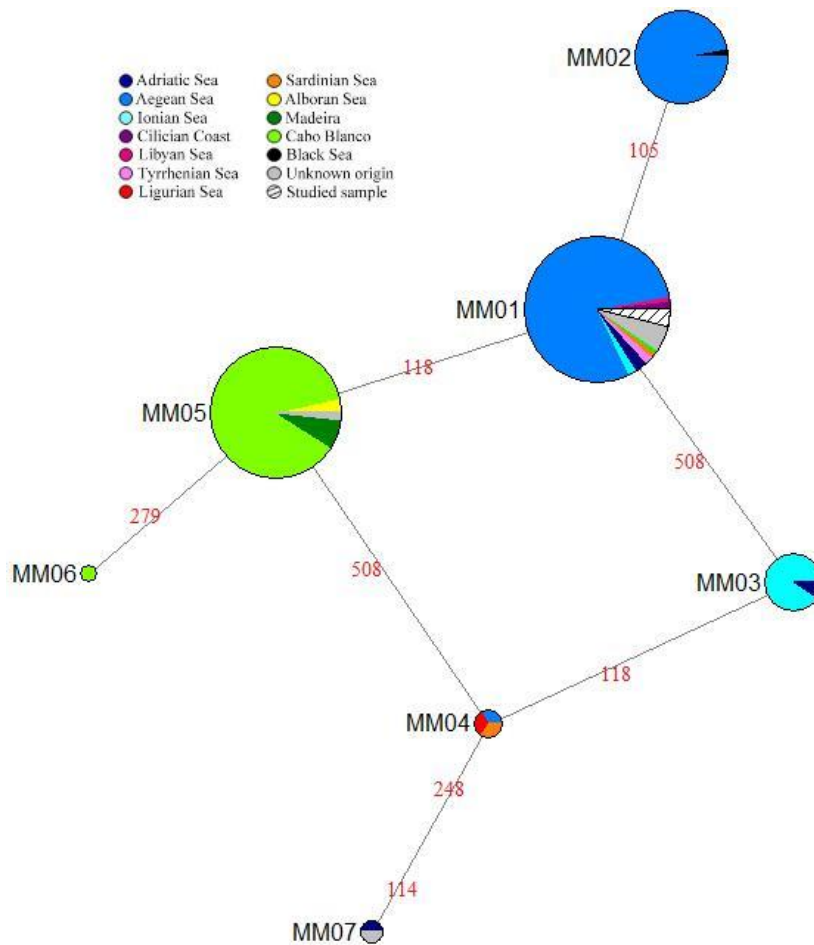


Fig. 27 - Median joining network dei sette aplotipi di foca monaca mediterranea. I colori indicano le posizioni geografiche di campionamento. La dimensione di ciascun cerchio è proporzionale alla frequenza dell'aplotipo. I numeri in rosso indicano le posizioni con mutazioni

3.2 DNA moderno

L'analisi genetica dell'individuo ha permesso di amplificare e sequenziare con successo un frammento di 524 bp dell'HVR1 della regione di controllo del mtDNA. Il DNA mitocondriale è stato estratto sia da tessuto muscolare che dal fegato e con entrambi i campioni ha dato un risultato positivo, risultato che ci si aspettava essendo tessuto fresco e non danneggiato. Il confronto di tutte le sequenze ottenute con quelle presenti in GenBank eseguito con BLAST ha confermato l'identità della specie *Monachus monachus* per questo campione. La sequenza ottenuta è stata archiviata in GenBank con il codice di accesso MT524708. Dopo l'allineamento di questa sequenza con quello dei sette aplotipi di foca monaca mediterranea finora conosciuti, sono stati individuati sei siti diagnostici, che hanno consentito l'assegnazione della sequenza del cucciolo all'aplotipo MM03. Il median joining network e la letteratura a disposizione hanno messo in evidenza che l'aplotipo MM03 è stato precedentemente osservato solo negli individui che abitano le isole greche del Mar Ionio quali Corfù, Cefalonia, Zante e in un campione del Mar Adriatico. La distribuzione di questo aplotipo è estremamente ridotta e si può dedurre che la madre di questo cucciolo provenisse proprio da questa zona e, una volta attraversato il canale d'Otranto, sia giunta sulla costa adriatica della Puglia.

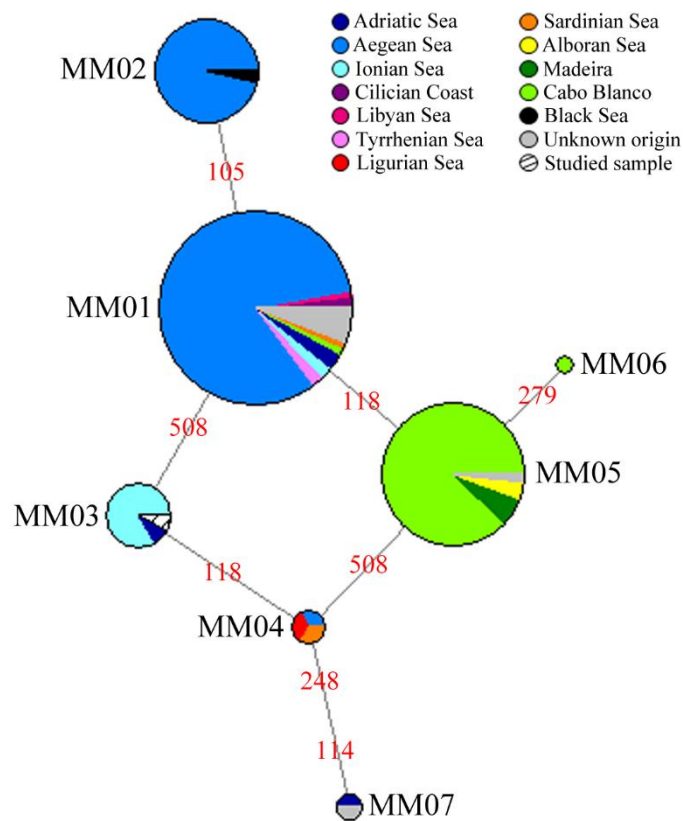


Fig. 28 - Median joining network dei sette aplotipi di foca monaca mediterranea. I colori indicano le posizioni geografiche di campionamento. La dimensione di ciascun cerchio è proporzionale alla frequenza dell'aplotipo. I numeri in rosso indicano le posizioni con mutazioni

3.3 Citizen science

Grazie alle ricerche online ho potuto raccogliere 38 avvistamenti di foca monaca mediterranea in Italia dal 1998 al 31 dicembre 2021 e per 20 avvistamenti è presente una documentazione fotografica e/o videografica.

Solo in pochissimi casi si è potuto risalire alla classe di età e al sesso dell'animale avvistato perché o non erano presenti foto e/o video e le persone che avevano visto l'animale non erano in grado di riferire molti dettagli o perché, laddove questi erano presenti, raramente erano fatti da vicino o con una qualità tale da poter determinare le caratteristiche dell'individuo. Le foche sono state osservate quasi sempre in mezzo al mare intente a nuotare. Le uniche eccezioni riguardano gli animali ripresi dalle fototrappole dell'Area Marina Protetta delle Isole Egadi che mostrano questi Pinnipedi all'interno di grotte sottomarine e il cucciolo che si è spiaggiato nel gennaio 2020 sulla spiaggia di Torchiarolo, in provincia di Brindisi. Le osservazioni dirette sono state riportate da pescatori sportivi e di professione, da subacquei e da persone che erano in riva al mare per una semplice passeggiata. Le osservazioni indirette sono state invece possibili grazie alle fototrappole poste dalla AMP delle Isole Egadi in collaborazione con ISPRA per il monitoraggio della foca monaca mediterranea in Italia nelle isole di Favignana, Marettimo e Levanzo. Delle osservazioni raccolte da me a livello regionale tre sono state riportate in Abruzzo, cinque in

Basilicata, quattro in Calabria, una in Campania, sei in Puglia, undici in Sicilia, cinque in Toscana e tre in Veneto.

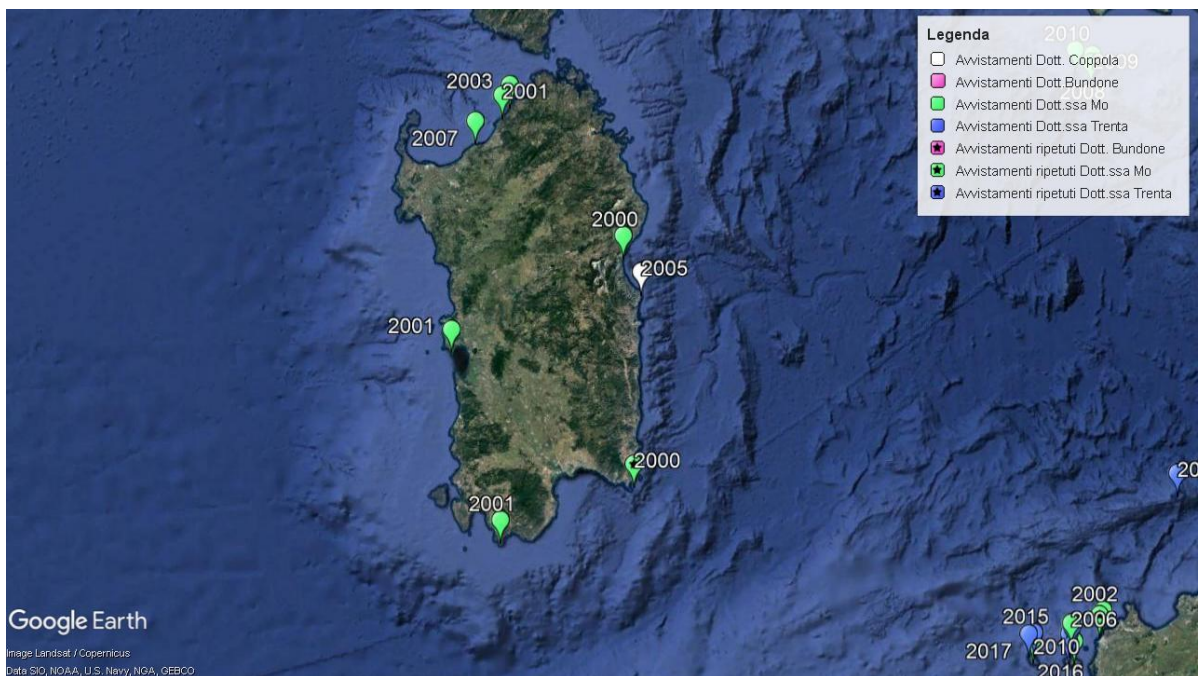
Solo dal 2017 ho potuto raccogliere informazioni più dettagliate sul periodo dell'anno in cui sono state osservate le foche monache mediterranee perché nel periodo precedente le testimonianze riportate negli articoli di giornale o sui social in molti casi riportavano solo l'anno dell'avvistamento mentre dal 2017 fino al 31 dicembre 2021 ho trovato sempre informazioni anche sul mese in cui era avvenuta l'osservazione. Su 38 osservazioni, quattro sono avvenute nel mese di gennaio, tre a marzo, due ad aprile, una a maggio, cinque a giugno, tre a luglio, una ad agosto, tre a settembre, tre ad ottobre, tre a novembre e una nel mese di dicembre. Sommando alle osservazioni raccolte da me quelle dello studio di Mo (2011) e di Bundone (2016) dal 1998 al 31 dicembre 2021 sono stati registrati 78 avvistamenti e in due casi si è trattato di due individui insieme mentre nel resto dei casi si trattava di un singolo individuo. Gli avvistamenti si sono verificati in Abruzzo (tre osservazioni), Basilicata (sei osservazioni), Calabria (sette osservazioni), Campania (una osservazione), Lazio (tre osservazioni), Liguria (una osservazione), Puglia (17 osservazioni), Sardegna (otto osservazioni), Sicilia (22 osservazioni), Toscana (sette osservazioni) e Veneto (tre osservazioni). L'anno in cui sono stati riportati più record è il 2020 con 14 osservazioni seguito dal 2021 con nove osservazioni.

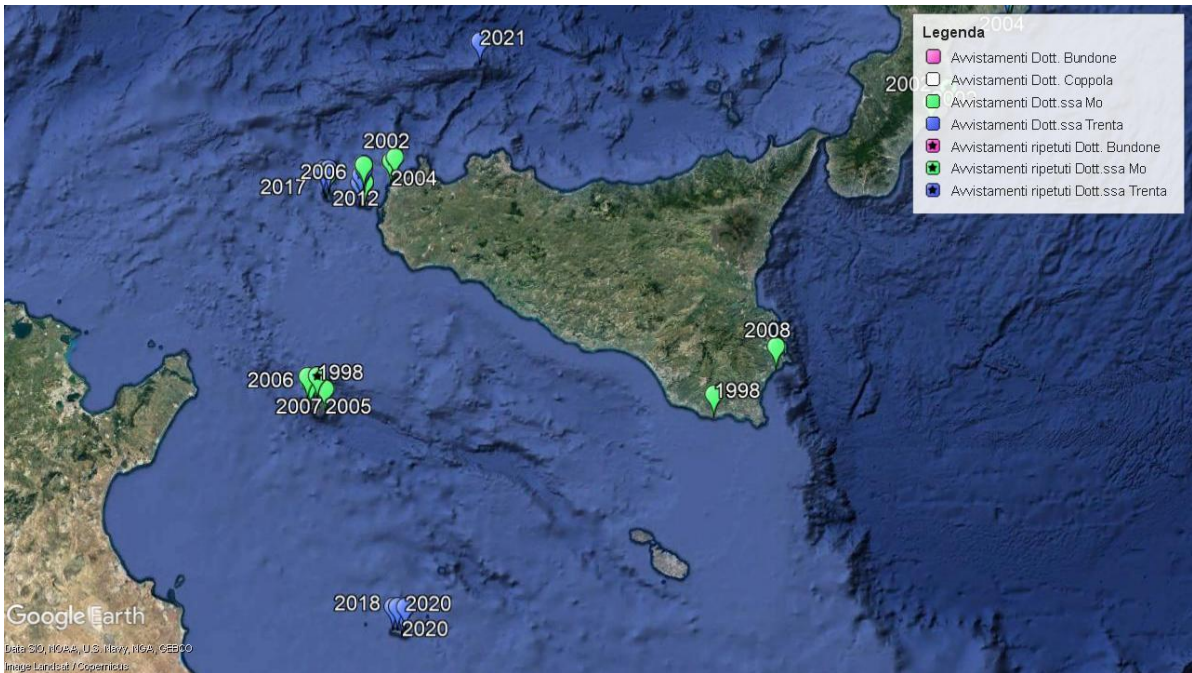
Tab. 6 - Avvistamenti di foca monaca mediterranea dal 1998 al 31 dicembre 2021. In verde sono indicati gli avvistamenti raccolti nello studio di Mo (2011), in fucsia gli avvistamenti raccolti nello studio di Bundone (2016), in arancione quelli raccolti da Coppola e infine in azzurro quelli raccolti da me tramite ricerche online

DATA (gg/mm/aaaa)†	LOCALITA'	COMUNE	PROVINCIA	REGIONE	INDIVIDUI	DOCUMENTAZI ONE	NOTE	RILEVATORE
1998	Marina di Modica	Modica	Ragusa	Sicilia	1			Mo
1998		Pantelleria	Trapani	Sicilia	1		avvistamenti ripetuti (2)	Mo
2000		Brindisi	Brindisi	Puglia	1			Mo
2000	Golfo di Orosei	Orosei	Nuoro	Sardegna	1			Mo
2000		Villasimius	Sud Sardegna	Sardegna	1	fotografia	avvistamenti ripetuti (2)	Mo
2001	Costa Paradiso	Trinità d'Agultu	Sassari	Sardegna	1			Mo
2001	San Giovanni di Sinis	Cabras	Oristano	Sardegna	1			Mo
2001	Capo Teulada	Teulada	Sud Sardegna	Sardegna	1			Mo
2001	Isole Egadi	Favignana	Trapani	Sicilia	1			Mo
mag-02		Policoro	Matera	Basilicata	1	fotografia		Mo
2002	Riace Marina	Riace	Reggio Calabria	Calabria	1		avvistamenti ripetuti (2)	Mo
2002		Roccella Ionica	Reggio Calabria	Calabria	1		avvistamenti ripetuti (2)	Mo
2002		Trapani	Trapani	Sicilia	1			Mo
2002	Le Castella	Isola di Capo Rizzuto	Crotone	Calabria	1			Mo
apr-03	Porto Miggiano	Santa Cesarea Terme	Lecce	Puglia	1			Coppola
2003	Costa Paradiso	Trinità d'Agultu	Sassari	Sardegna	1			Mo
2003		Otranto	Lecce	Puglia	1			Mo
2004	Le Castella	Isola di Capo Rizzuto	Crotone	Calabria	1			Trenta
2004		Trapani	Trapani	Sicilia	1		avvistamenti ripetuti (2)	Mo
26/08/2005	Capo Monte Santu	Orosei	Nuoro	Sardegna	2			Coppola
2005		Pantelleria	Trapani	Sicilia	1			Mo
2006	Isole Egadi	Favignana	Trapani	Sicilia	1	fotografia		Mo
2006		Pantelleria	Trapani	Sicilia	1			Mo
2007		Pantelleria	Trapani	Sicilia	1			Mo
2007		Castelsardo	Sassari	Sardegna	1	fotografia		Mo
2008	Fontane Bianche	Siracusa	Siracusa	Sicilia	1			Mo
2008	Isole Pontine	Ponza	Latina	Lazio	1			Mo
2009	Isola d'Elba		Livorno	Toscana	1	fotografia		Mo
mar-09	Il Ciolo	Gagliano del Capo	Lecce	Puglia	1			Bundone
giu-09		Isola del Giglio	Grosseto	Toscana	1	fotografia		Mo
04/10/2009		Ponza	Latina	Lazio	1			Mo
apr-10		Otranto	Lecce	Puglia	1		avvistamenti ripetuti (2)	Bundone
18/06/2010		Portofino	Genova	Liguria	1	fotografia		Mo
2010	Isole Egadi	Favignana	Trapani	Sicilia	1			Mo
2010	Isole Pontine	Ponza	Latina	Lazio	1			Mo
nov-10		Patù	Lecce	Puglia	1			Bundone

2011	Le Castella	Isola di Capo Rizzuto	Crotone	Calabria	1			Trenta
autunno - inverno 2011	Isole Egadi	Favignana	Trapani	Sicilia	1	ripresa da fototrappole	avvistamenti ripetuti	Trenta
primavera 2012	Isole Egadi	Favignana	Trapani	Sicilia	1	ripresa da fototrappole	avvistamenti ripetuti	Trenta
2012	Riserva Naturale Orientata Bosco	Policoro	Matera	Basilicata	1			Trenta
12/08/2013	Isola Verde	Chioggia	Venezia	Veneto	1	video		Trenta
nov-13	Torre Sant'Andrea	Melendugno	Lecce	Puglia	2			Bundone
lug-14	San Foca	Melendugno	Lecce	Puglia	1		probabilmente è sempre lo stesso individuo	Bundone
lug-14	Torre dell'Orso	Melendugno	Lecce	Puglia	1		probabilmente è sempre lo stesso individuo	Bundone
lug-14	Roca Vecchia	Melendugno	Lecce	Puglia	1		probabilmente è sempre lo stesso individuo	Bundone
30/09/2014	Riserva Naturale Orientata Bosco Pantano di Policoro	Policoro	Matera	Basilicata	1			Trenta
01/11/2014		Santa Cesarea Terme	Lecce	Puglia	1			Bundone
2015	Marettimo	Favignana	Trapani	Sicilia	1			Trenta
inverno 2016	Isole Egadi	Favignana	Trapani	Sicilia	1	ripresa da fototrappole		Trenta
12/06/2017		Tricase	Lecce	Puglia	1	video		Trenta
17/06/2017	Marettimo	Favignana	Trapani	Sicilia	1			Trenta
05/07/2017	Rosolina Mare	Rosolina	Rovigo	Veneto	1			Trenta
01/12/2017		Favignana	Trapani	Sicilia	1	ripresa da fototrappole		Trenta
10/07/2018	Isola Verde	Chioggia	Venezia	Veneto	1			Trenta
18/11/2018	Isola di Lampedusa	Lampedusa e Linosa	Agri gento	Sicilia	1	video		Trenta
24/01/2020	Frigole	Lecce	Lecce	Puglia	1	fotografie e video	cucciolo che poi è morto a Torchiarolo	Trenta
27/01/2020	Torre San Gennaro	Torchiarolo	Brindisi	Puglia	1	fotografie e video	cucciolo spiaggiato e poi morto	Trenta
mag-20	Isola di Capraia	Capraia Isola	Livorno	Toscana	1			Trenta
giu-20	Isola di Capraia	Capraia Isola	Livorno	Toscana	1			Trenta
09/06/2020	Isola di Capraia	Capraia Isola	Livorno	Toscana	1	video		Trenta
02/07/2020	Isola di Capraia	Capraia Isola	Livorno	Toscana	1	fotografia		Trenta
21/08/2020	foce fiume Bradano a Metaponto	Bernalda	Matera	Basilicata	1			Trenta
10/09/2020	tra la foce del fiume Vomano e la foce del fiume Tordino	Giulianova, Roseto degli Abruzzi	Teramo	Abruzzo	1			Trenta
12/09/2020	foce fiume Tordino	Giulianova	Teramo	Abruzzo	1			Trenta
14/09/2020	al largo della foce del fiume Salinello	Giulianova e Tortoreto	Teramo	Abruzzo	1			Trenta
02/10/2020	costa orientale dell'Isola di Pianosa	Campo nell'Elba	Livorno	Toscana	1	video		Trenta
22/10/2020	Isola di Lampedusa	Lampedusa e Linosa	Agri gento	Sicilia	1	video		Trenta
06/11/2020	Isola di Lampedusa	Lampedusa e Linosa	Agri gento	Sicilia	1	video		Trenta
18/11/2020	Isola di Lampedusa	Lampedusa e Linosa	Agri gento	Sicilia	1	video		Trenta
06/01/2021	AMP di Porto Cesareo	Porto Cesareo	Lecce	Puglia	1	fotografie e video		Trenta
gen-21	Metaponto	Bernalda	Matera	Basilicata	1	video		Trenta
mar-21		Cirò Marina	Crotone	Calabria	1			Trenta
mar-21		Policoro	Matera	Basilicata	1			Trenta
31/03/2021	Schiavonea	Corigliano - Rossano	Cosenza	Calabria	1			Trenta
14/04/2021	AMP Isola di Ustica	Ustica	Palermo	Sicilia	1	video		Trenta
23/04/2021	Gallipoli	Gallipoli	Lecce	Puglia	1	fotografia		Trenta
10/05/2021	Seno del Canneto	Gallipoli	Lecce	Puglia	1			Trenta
01/10/2021		Salerno	Salerno	Campania	1	video		Trenta

Fig. 29 - Mappe degli avvistamenti di foca monaca mediterranea in Italia dal 1998 al 31 dicembre 2021 con focus sulle regioni con più avvistamenti come Sardegna, Sicilia, Calabria, Basilicata e Puglia. I nomi nella legenda indicano gli autori degli studi da cui sono stati prese le notizie riguardo gli avvistamenti





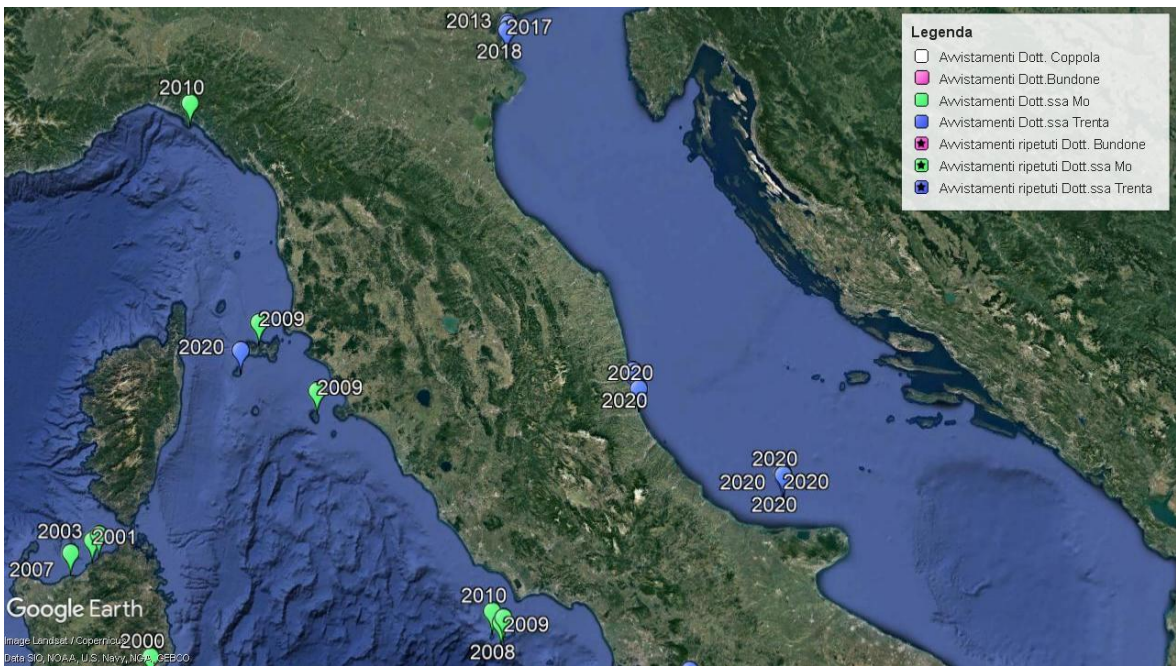
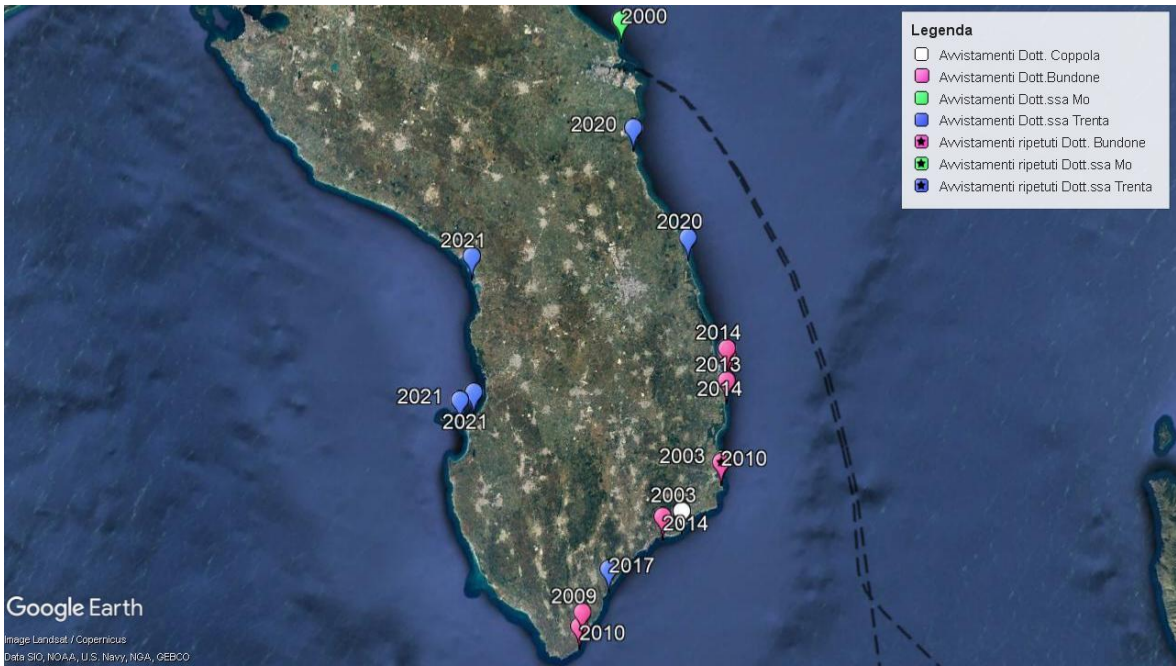
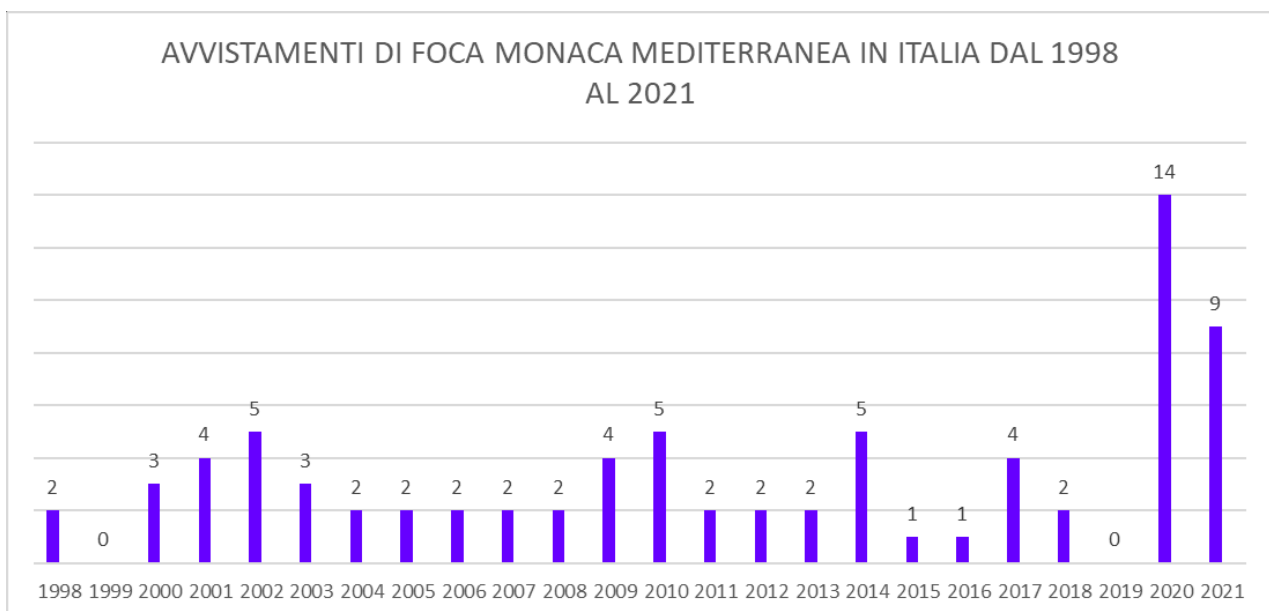
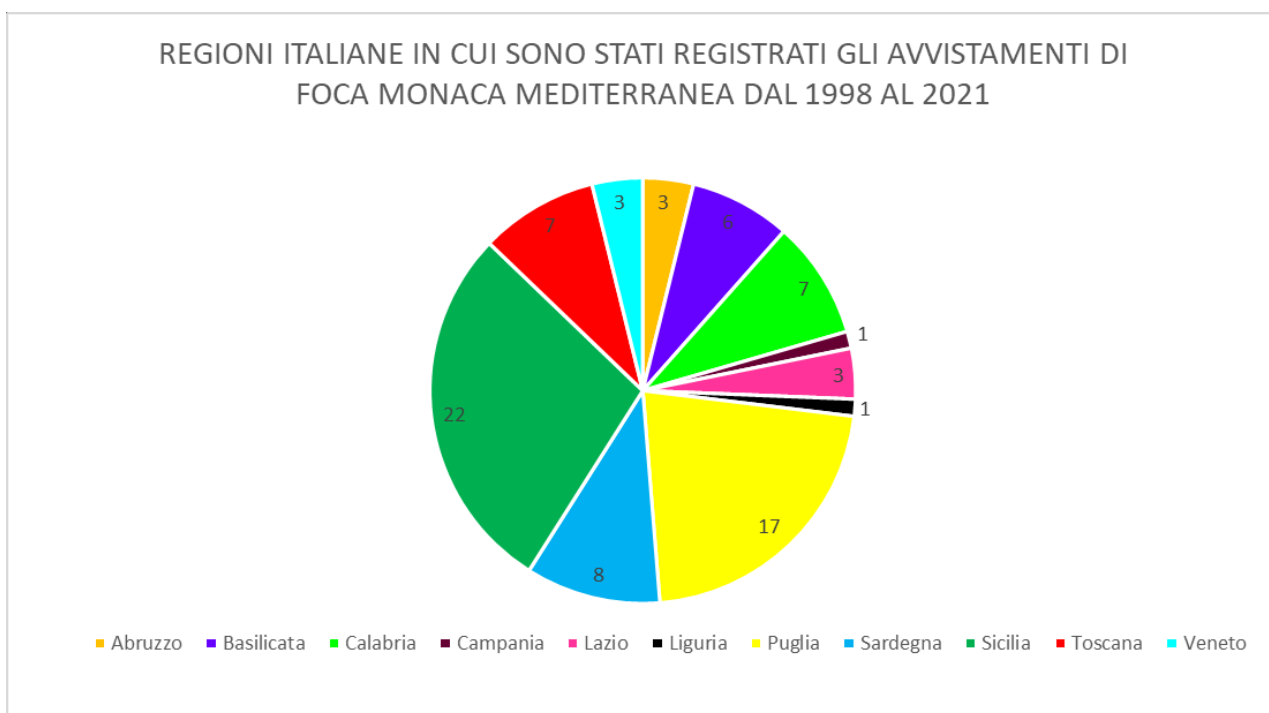
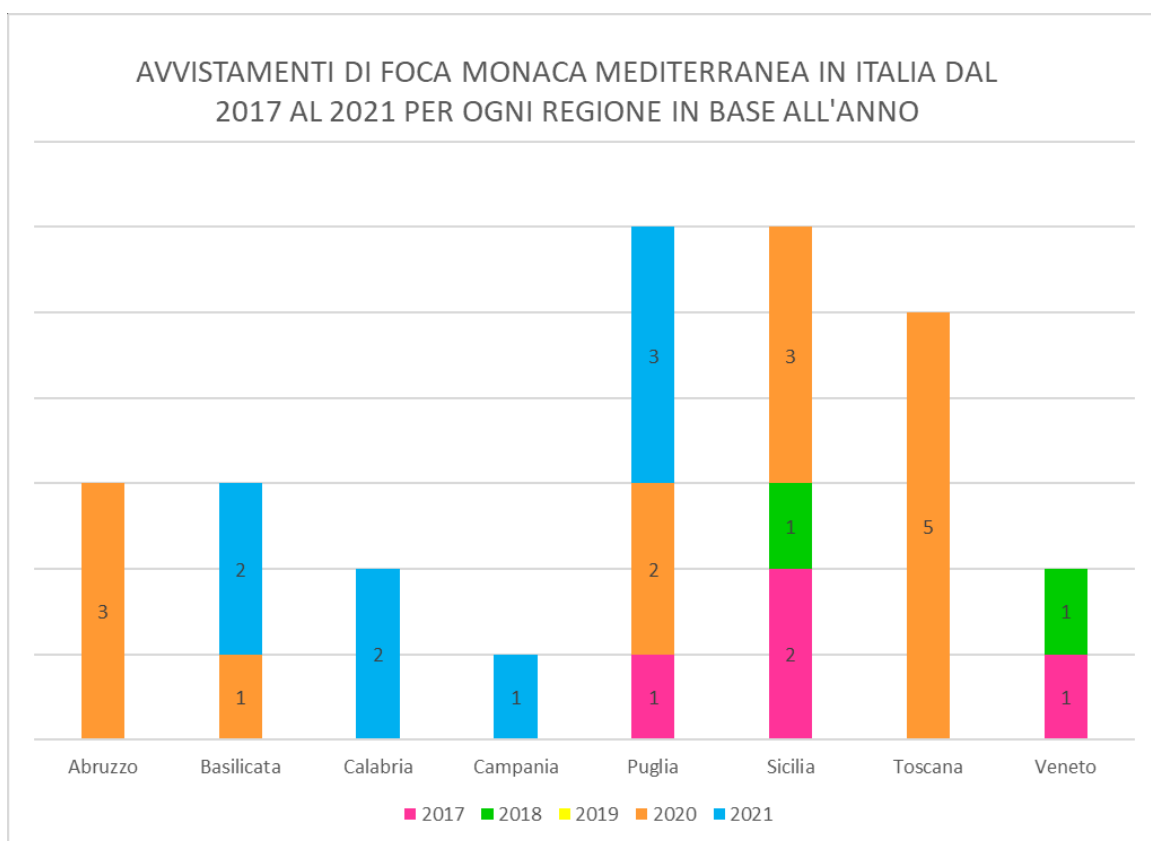
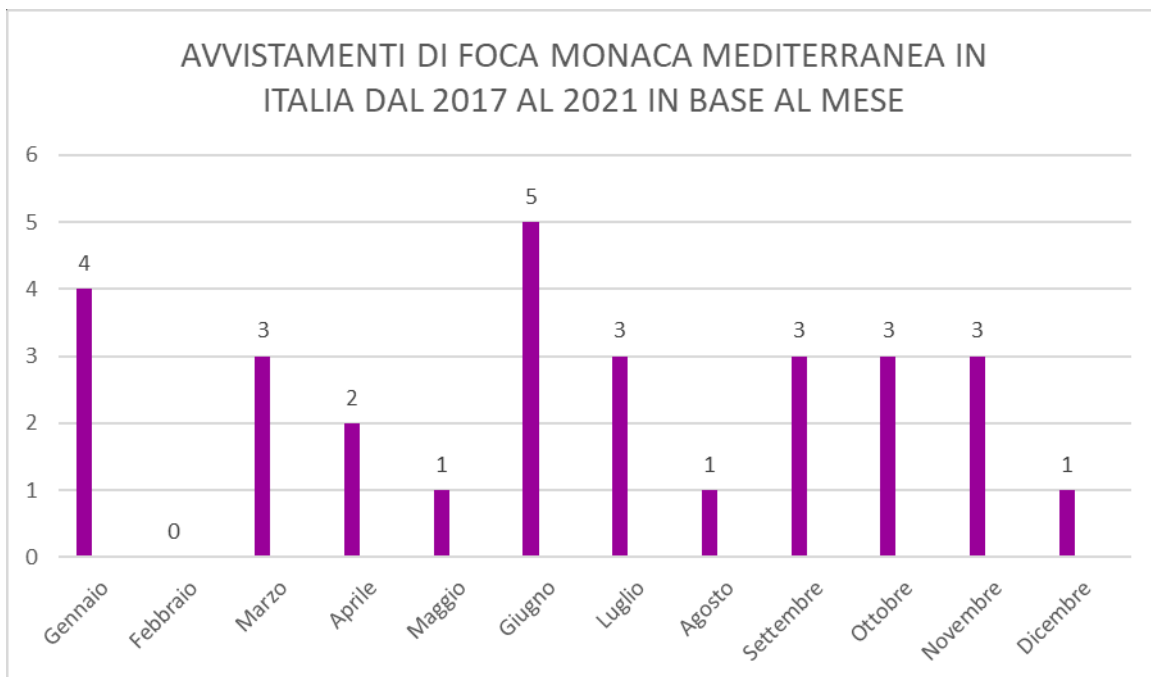
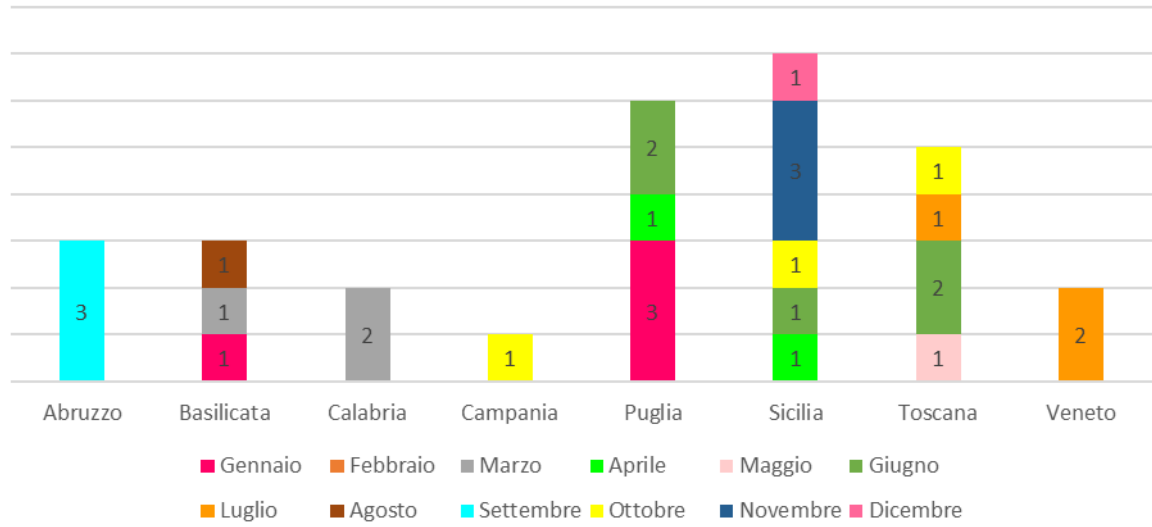


Fig. 30 – Grafici che riportano gli avvistamenti di foca monaca mediterranea in Italia dal 1998 al 31 dicembre 2021





AVVISTAMENTI DI FOCA MONACA MEDITERRANEA IN ITALIA
DAL 2017 AL 2021 PER OGNI REGIONE IN BASE AL MESE



Capitolo quarto

DISCUSSIONE

Nel corso del presente studio sul DNA antico di reperti di foca monaca mediterranea è stato possibile raccogliere poche informazioni sul polimorfismo del DNA mitocondriale, verosimilmente a causa del cattivo stato di conservazione dei reperti utilizzati, sottolineando le difficoltà tecniche riguardanti le analisi genetiche effettuate sul DNA antico.

I quattro campioni con esito positivo hanno mostrato l'aplotipo MM01, il più comune e diffuso nel Mar Mediterraneo; questi campioni provengono dalla Sicilia, dalla Sardegna, dall'Isola dell'Elba e dal Golfo di Napoli, confermando che l'aplotipo MM01 è presente anche nel Mediterraneo centrale.

L'uso di campioni storici consente una valutazione diretta della perdita di diversità genetica nel tempo (Rosenbaum et al. 2000). Nel caso di specie geneticamente depauperate a rischio di estinzione, l'analisi di campioni storici può consentire di indagare se le attività umane abbiano avuto un impatto diretto sulla perdita di diversità genetica (Matocq e Villablanca 2001, Wadeler et al. 2007, Casas-Marce et al. al. 2017). Screening della diversità mitocondriale di *Monachus monachus* negli ultimi 180 anni hanno dimostrato che la specie era già geneticamente depauperata almeno dalla metà del XIX secolo (Gaubert et

al. 2019). Tali livelli bassi di diversità mitocondriale corrispondono a livelli osservati in altre specie di mammiferi sull'orlo dell'estinzione (Rosel e Rojas-Bracho 1999, Rosenbaum et al. 2000, Weber et al. 2000, Johnson et al. 2004, Rodriguez et al. 2011, Casas-Marce et al. 2017).

I risultati dello studio di Gaubert et al. (2019) e Karamanlidis et al. (2016b) testimoniano anche l'impatto deleterio delle estinzioni locali sulla variabilità genetica di una specie distribuita in modo irregolare come la foca monaca mediterranea. Infatti, l'aplotipo MM07, che è stato registrato in due campioni storici provenienti dalla Francia (risalente a prima del 1850) e dalla Croazia ("Dalmazia"; risalente probabilmente a prima della Prima guerra mondiale), è probabilmente estinto perché non è stato rilevato nei 180 campioni recenti che sono stati sequenziati finora. Stessa sorte potrebbe essere capitata all'aplotipo MM04, aplotipo un tempo frequente nei mari italiani ma che non viene rilevato da molto tempo, come rilevato anche in questo lavoro di tesi.

I campioni analizzati in questo studio sono stati dieci ma solo quattro hanno dato un risultato positivo e di questi quattro campioni, ben tre erano dei denti, dimostrando come questa parte anatomica sia fra le migliori per le analisi sul DNA antico. Le parti anatomiche che invece hanno dato i risultati peggiori sono stati i tessuti esterni, questo perché solitamente sono le parti più esposte a una rapida degradazione del DNA e inoltre trattate con varie sostanze durante le

operazioni di imbalsamazione con effetti negativi sulla conservazione del DNA.

I campioni con esito positivo risalgono alla metà del XX tranne nel caso di uno che risale al 1890. Due campioni che hanno dato esito negativo sono del 1965 e del 1967 quindi in questo caso l'età dei campioni non ha influito molto sul risultato finale, ha avuto sicuramente più influenza la tipologia di tessuto e il modo in cui è stato conservato il reperto.

Un chiaro esempio del ruolo delle condizioni di conservazione sulla qualità del DNA antico è rappresentato dal campione proveniente dall'isola di Capri (Fig. 31). L'osso risale al 4000 a.C. circa ed è stato ritrovato nella grotta delle Felci. Come è ben noto le felci sono piante che necessitano di molta umidità per sopravvivere, sono specie igrofile (Beccarisi e Chiriaco, 2002) dunque questa grotta doveva essere sicuramente un luogo molto umido il cui clima non ha favorito la conservazione del DNA all'interno del reperto, sebbene le ossa siano uno dei materiali migliori da cui estrarre il DNA (Adler et al. 2011, Higgins et al. 2013, Gilbert et al. 2003).

Da notare che l'omero di foca monaca esaminato presenta dei segni di scalfittura di chiara origine antropica (Nicola Maio, comunicazione personale), prova che questo esemplare fu utilizzato come fonte di cibo dalla popolazione umana preistorica dell'Isola di Capri.



Fig. 31 – *L'osso proveniente dall'isola di Capri*

A tale riguardo, è interessante riportare che sono disponibili numerosi dati archeologici riguardanti la presenza di resti Mammiferi marini nei siti paleolitici sulle coste del Mediterraneo occidentale dell'Europa (Such 1920, Garrod et al. 1928, Blanc 1930). Ci possono essere due spiegazioni sul motivo per cui le foche sono state sfruttate: la possibilità di catturarle e i prodotti che potevano fornire. Questo animale offre carne e tutta una gamma di prodotti di grande pregio. In primo luogo, la loro pelle è di ottima qualità per la realizzazione di indumenti impermeabili ed è stata molto apprezzata nel corso della storia, diventando anche il tipo di pelle più costoso secondo l'editto di Diocleziano (Gonzalez 1999, Johnson 2004, Johnson e Lavigne 1999). Un altro prodotto interessante è il loro grasso, che rappresenta il 30-40% del loro peso corporeo ed è molto ricco di acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi n-3 e n-6

(Henderson et al. 1994, Lyman et al. 1992, Yazici e Otürk 1996), rendendolo un'importante fonte di nutrimento, sebbene fosse utilizzato anche come combustibile e per il trattamento della pelle (Johnson 2004, Johnson e Lavigne 1999, Kiraç e Savas, 1996).

Anche in epoca storica si può notare che le foche monache sono state spesso menzionate durante il periodo greco e romano come presenti lungo le coste rocciose e anche sulle spiagge. Fin dai tempi antichi, l'animale era cacciato per la sua pelle, carne, grasso e olio, ma fu solo in epoca romana che la popolazione di foche si esaurì gravemente. Ci fu un parziale recupero di numero dopo la caduta dell'Impero Romano, ma le foche monache furono nuovamente in pericolo durante il Medioevo dove cercavano rifugio lungo coste impervie e spesso in grotte marine, alcune solo con ingressi sottomarini. Il vasto territorio precedentemente occupato dalle foche monache fu rapidamente limitato dal crescente uso e occupazione delle zone costiere da parte dell'uomo (De Waele et al. 2009).

È stato proprio questo sfruttamento sin dai tempi più antichi, oltre al conflitto con i pescatori, ad aver portato la foca monaca mediterranea sull'orlo dell'estinzione ma da qualche tempo, grazie a misure di protezione e alla riduzione del conflitto con i pescatori, questo animale si sta riprendendo quei territori che un tempo già gli appartenevano. Segni di questa ricolonizzazione

sono sicuramente gli avvistamenti che aumentano sempre di più nel corso degli anni lungo le coste italiane e anche lo spiaggiamento di un esemplare di questa specie avvenuto nel gennaio 2020 a Torchiarolo, in provincia di Brindisi.

L'animale spiaggiato era una femmina dal peso di 22,5 kg e dalla lunghezza di 118 cm. Il colore del pelo, il peso e la lunghezza suggeriscono che l'animale era un cucciolo di circa 2-4 mesi di età: da ciò si può dedurre che molto probabilmente questo animale era nato lungo le coste pugliesi in autunno. Questa ipotesi è avvalorata dalla presenza in quest'area di numerosi habitat adatti alla riproduzione delle foche monache (Bundone et al. 2014) e dal fatto che a soli 2-4 mesi il cucciolo sarebbe ancora allattato dalla madre e incapace di attraversare grandi tratti di mare aperto. Le femmine di foca monaca del Mediterraneo danno alla luce un solo cucciolo all'anno utilizzando le grotte costiere come rifugio. Il parto avviene solitamente da settembre a novembre (Pastor e Aguilar 2003, Gucu et al. 2004, Karamanlidis et al. 2010) e il cucciolo viene allattato fino a cinque mesi di età, dopodiché inizia a muoversi e alimentarsi in maniera autonoma (Aguilar et al. 2007, Kirac e Ok 2019). La grande capacità delle foche monache di percorrere lunghe distanze in mare aperto e i risultati genetici indicano probabilmente che la madre del cucciolo era un individuo in dispersione proveniente dalle isole greche nel Mar Ionio che ha scelto per il parto le coste pugliesi. La costa pugliese si presenta ricca di

cavità originatesi per fenomeni di erosione marina unitamente a quelli di carsismo. Numerose cavità sono dotate di un sistema di sifoni che immette in sale interne asciutte provviste di spiaggette ciottolose e scogli levigati. Sono, queste, condizioni ideali per la vita della foca monaca mediterranea che, pur non essendo un animale cavernicolo in senso stretto, trova all'interno delle grotte costiere quel minimo di sicurezza che ne permette la sopravvivenza (Di Turo 1984).

L'individuo studiato ha mostrato l'aplotipo MM03, uno dei meno comuni nell'attuale areale di distribuzione della specie (Karamanlidis et al. 2016b, Gaubert et al. 2019). L'aplotipo MM03 è stato precedentemente trovato solo in 10 individui campionati dalle isole greche (Cefalonia e Zante) nel Mar Ionio (Karamanlidis et al. 2016b) e da un individuo nel Mar Adriatico (Gaubert et al. 2019). Quest'ultimo era un esemplare da museo che era stato catturato lungo la costa occidentale di Brac (Croazia) nel 1914 (Gaubert et al. 2019). Il cluster del Mar Ionio porta con sé una porzione del patrimonio evolutivo della foca monaca mediterranea che non si trova nel Mar Egeo e per questo deve essere considerato come un'importante unità per la conservazione di questa specie (Karamanlidis 2021). A causa dell'assenza di popolazioni riproduttive della specie, la foca monaca mediterranea è attualmente considerata “probabilmente estinta” all'interno del mare Adriatico e i pochi individui censiti in questo

bacino sono generalmente considerati “vaganti”, individui provenienti da aree in cui la specie è più abbondante e riproduttivamente attiva (Bundone et al. 2019, Mo 2011). Mentre le acque adriatiche sono abitate solo sporadicamente dalle foche monache mediterranee, le Isole Ionie ospitano ancora diversi individui di *Monachus monachus*. Infatti, una delle più grandi popolazioni di questa specie si trova nel Mar Mediterraneo orientale e circa 300-400 individui sono distribuiti lungo le coste greche (Karamanlidis 2016a). Le Isole Ionie sono siti importanti per la conservazione della foca monaca mediterranea perché caratterizzate da un habitat costiero eterogeneo, che comprende sia spiagge sabbiose aperte sia diverse zone rocciose, con grotte marine adatte a sostare e nidificare le foche monache (Panou et al. 1993, Panou 2009).



Fig. 32 – *Mapa della regione adriatico-ionica che mostra la distribuzione aplotipica delle foche monache mediterranee precedentemente analizzata. Sono presenti solo i dati con posizioni geografiche corrette. Il cerchio indica i dati di Karamanlidis et al. (2016b), il triangolo indica i dati di Gaubert et al. (2019) e la stella indica il luogo in cui è stato trovato spiaggiato il cucciolo analizzato in questo studio.*

Per quanto riguarda gli avvistamenti di foca monaca mediterranea in Italia, si può notare un aumento significativo di segnalazioni negli ultimi anni e questo aumento può essere dovuto ad una maggiore attenzione delle persone nei confronti della salvaguardia dell'ambiente ma anche ad una possibile ricolonizzazione di territori nei quali questo pinnipede un tempo era già presente e dai quali, a causa delle persecuzioni da parte dell'uomo, si è estinta. Questo Pinnipede era fino a qualche decennio fa piuttosto comune lungo le coste frastagliate del Tirreno, in particolare della Sardegna, e del Medio e Basso

Adriatico. A riprova della sua passata diffusione, sono conosciute diverse denominazioni con le quali è nota presso le popolazioni costiere: “bove di mare” nell’Alto Tirreno, “foca”, “bai”, “vitellu marinu” in Sardegna, “foca marina” in Calabria, “vacca di mare” o “bove di mare” in Sicilia, “bue marino” o “foca bianca” in Puglia. La sua presenza ha suggerito il nome di diverse località costiere: numerose le grotte del bue marino, ce ne sono quattro nella sola Sardegna, la più famosa delle quali nel Golfo di Orosei e poi una in Sicilia presso l’isola di Filicudi (arcipelago delle Isole Eolie) e una in Puglia, nell’Isola di San Domino (arcipelago delle Isole Tremiti). Sempre in Puglia, e questa volta nel Salento, c’è la Grotta della Foca e la Caverna della Monaca (Di Turo 1984).

Il picco degli avvistamenti c’è stato nel 2020 con 14 osservazioni, seguito dal 2021 con nove osservazioni. Le regioni in cui si sono concentrati gran parte degli avvistamenti dal 1998 al 2021 sono la Sicilia, la Puglia e la Sardegna, regioni in cui è sempre stata nota la presenza di *Monachus monachus* come detto in precedenza.

È stato possibile avere una stagionalità degli avvistamenti solo dal 2017 al 2021 a causa delle notizie non troppo precise trovate negli anni precedenti e in questi cinque anni il maggior numero di avvistamenti si è verificato in giugno (cinque avvistamenti) seguito da gennaio con quattro avvistamenti.

Gli studi sul comportamento e la capacità migratoria della foca monaca mediterranea sono estremamente rari a causa della difficoltà nell'eseguire esperimenti di marcatura e tracciamento. Tuttavia, osservazioni effettuate in diverse aree della Grecia hanno messo in evidenza la capacità dei subadulti e degli adulti di coprire una distanza totale di 100–300 km, con una media giornaliera di 10–40 km (Adamantopoulou et al. 2011). Inoltre, individui giovani sono stati osservati anche in aree a centinaia di chilometri dalla loro presunta origine (Mo 2011, Bayed 2001, Alfaghi 2013). Una giovane femmina di circa sei mesi è stata trovata morta in una rete da pesca lungo la costa libica. L'analisi genetica effettuata ha evidenziato una probabile origine nel Mar Mediterraneo orientale, suggerendo che il giovane individuo possa aver percorso centinaia di chilometri prima di essere catturato, alla ricerca probabilmente di una nuova area da colonizzare.

La dispersione potrebbe essere dovuta ad un aumento degli individui nelle colonie storiche e questo aumento potrebbe indurre una sorta di pressione sia per lo spazio che per le risorse trofiche su alcuni animali che decidono di lasciare i territori in cui sono nati alla ricerca di altri territori dove stabilirsi e magari dove creare in futuro una nuova colonia.

Con una popolazione mondiale stimata di circa 700 individui (Karamanlidis e Dendrinis 2015), singoli individui avvistati ripetutamente meritano attenzione

per la conservazione della specie alla luce della loro capacità di ricolonizzare aree in cui la foca monaca mediterranea era presente in passato (Roditi – Elasar et al. 2021).

Non bisogna trascurare il fatto che nel 2020 c'è stato il picco della pandemia da CoViD-19, dove tantissime attività umane sono state bloccate o comunque ridotte e questo potrebbe aver favorito i movimenti della foca monaca mediterranea grazie allo stop delle attività antropiche e di conseguenza al calo del disturbo causato dall'uomo. A livello globale il CoViD-19 e il relativo lockdown hanno simulato delle misure di protezione per l'ambiente e delle azioni di conservazione come lo stop o la diminuzione di attività umane in habitat chiave per le specie marine (Azzolin et al. 2020). Infatti, è stato verificato un aumento della frequenza degli avvistamenti di *Monachus monachus* nel Golfo di Corinto quindi la specie può aver beneficiato del basso impatto umano (Azzolin et al. 2020) e lo stesso può essere accaduto in Italia.

Lo stop della pesca e del traffico marittimo intenso, l'assenza dell'uomo lungo la costa e soprattutto nei potenziali habitat chiave per la specie e la diminuzione dei rumori sott'acqua possono aver giocato un ruolo importante nell'aumento delle osservazioni (Azzolin et al. 2020).

Le due aree principali attualmente abitate dalla foca monaca mediterranea sono separate da circa 4000 km e sembrano essere geneticamente isolate (Harwood

et al. 1996, Pastor et al. 2004, 2007 Karamanlidis et al. 2016b).

Tuttavia, la condivisione di aplotipi tra le popolazioni dell'Oceano Atlantico settentrionale e del Mar Mediterraneo supporta l'ipotesi che in passato questo Pinnipede costituisse una metapopolazione con flusso genico che collegava l'Atlantico fino al Mar Nero probabilmente tramite popolazioni geograficamente intermedie attualmente estinte (Pastor et al. 2007).

L'attuale separazione genetica tra le popolazioni riproduttive del Nord Atlantico e del Mediterraneo orientale potrebbe non essere stata presente in passato. L'attuale modello di bassa diversità genetica e isolamento della popolazione osservato è probabilmente spiegato da una serie di estinzioni storiche locali unite all'effetto della deriva genetica su piccole popolazioni riproduttive con già bassi livelli di diversità genetica (Gaubert et al. 2019).

Le pressioni antropogeniche nel recente passato hanno portato a un grave calo demografico (Murphy e Romanuk 2014) e a una sostanziale frammentazione delle popolazioni di fauna selvatica (Said et al. 2016). Di conseguenza, le popolazioni di fauna selvatica piccole e frammentate sono più vulnerabili alla deriva genetica e alla consanguineità (Frankham et al. 2002), che, a loro volta, possono ridurre la loro forma fisica e il potenziale evolutivo, portando alla fine le specie all'estinzione (Lacy 1997). La preoccupante situazione genetica della foca monaca mediterranea, la nostra limitata comprensione del suo ciclo

biologico e il basso numero di animali sopravvissuti richiedono un'attenzione scientifica immediata e azioni di conservazione efficaci e concrete (Karamanlidis et al. 2021).

Nonostante i recenti successi di conservazione, la perdita di biodiversità continua ad accelerare, minacciando non solo il futuro di numerose specie (Hoffmann et al. 2010) ma anche i servizi ecologici forniti all'intero ecosistema (Worm et al. 2006). Attualmente più di un quarto delle specie di mammiferi del mondo, solitamente animali di grandi dimensioni, è vicino all'estinzione (Anonymous 2010), un fatto che è considerato una grave minaccia per la biodiversità (Galetti e Dirzo 2013).

In questo caso azione di gestione e conservazione basate sulla scienza sono urgentemente richieste per la salvaguardia di queste specie (Boersma et al. 2011).

Capitolo quinto

CONCLUSIONI

Malgrado i risultati piuttosto negativi sul DNA antico, l'analisi genetica condotta sul cucciolo di foca monaca mediterranea rinvenuto lungo la costa pugliese suggerisce che esso possa essere nato in questa zona e che sua madre provenisse dalle isole greche del Mar Ionio. Questa ipotesi è sostenuta dalla condivisione dell'aplotipo MM03, comune nell'unica popolazione riproduttivamente attiva di foche monache all'interno della regione adriatico-ionica. Il ritrovamento di una foca monaca mediterranea nata lungo la costa pugliese è un evento importante che testimonia il recupero di questa specie nel bacino del Mediterraneo e la probabile ricolonizzazione di aree da cui era scomparsa. D'altra parte, la scarsa conoscenza del ciclo biologico, del comportamento e della reale distribuzione delle specie evidenzia la necessità di intensificare le attività di ricerca e monitoraggio. La raccolta di nuove informazioni su *Monachus monachus* consentirà di valutare l'attuale distribuzione delle foche monache all'interno del Mar Mediterraneo e di capire se esistono habitat adatti alla ricolonizzazione della specie e all'insediamento di nuove colonie riproduttive. Inoltre, nelle aree dove sono già presenti popolazioni di foca monaca mediterranea e in quelle adatte alla

ricolonizzazione, le attività di pesca potrebbero essere ben regolamentate e il grado di antropizzazione e di deterioramento dell'habitat costiero potrebbe essere ridotto. Lo sviluppo di adeguati piani di gestione sarà quindi utile per ridurre le minacce per la specie e per promuovere il recupero e la conservazione di questa specie all'interno del suo areale originario.

Malgrado le recenti misure di conservazione, le foche monache mediterranee continuano ad essere esposte a una serie di minacce sostanziali, tra cui la perdita e il deterioramento dell'habitat e l'uccisione volontaria (Karamanlidis e Dendrinis 2015), quest'ultima è la più frequente causa di morte nel Mar Egeo e nella costa mediterranea orientale della Turchia (Dede et al. 2015). Poiché le popolazioni sono piccole e frammentate, sono anche altamente sensibili a malattie ed eventi stocastici come l'evento di mortalità di massa osservato a Cabo Blanco nel 1997, che ha ucciso più di 200 animali (Karamanlidis et al. 2016a). Sebbene la capacità di questo Pinnipede di utilizzare le grotte marine per la riproduzione e il riparo possa aver temporaneamente salvato la specie dall'estinzione (Bareham e Furreddu 1975), sarà fondamentale per la sua sopravvivenza a lungo termine valutare se la bassa diversità genetica osservata nella specie è associata a depressione da inincrocio, fitness inferiore e minore adattabilità come previsto dalle assunzioni della genetica di popolazione e della conservazione (Lande 1998, Spielman et al. 2004, Frankham 2005).

BIBLIOGRAFIA

- Abou-Zahra A. (2013) *Rare and pregnant monk seal falls victim to Arab instability*. International Fund for Animal Welfare. <http://www.ifaw.org/united-kingdom/news/rare-and-pregnant-monk-seal-falls-victim-arab-instability>.
- Adamantopoulou S., Androukaki E., Dendrinou P., Kotomatas S., Paravas V., Psaradellis M., Tounta E., Karamanlidis A.A. (2011) *Movements of Mediterranean monk seals (*Monachus monachus*) in the eastern Mediterranean Sea*. *Aquat. Mamm.* 37, 256.
- Adamantopoulou S., Androukaki E., Kotomatas S. (1999) *The distribution of the Mediterranean monk seal in Greece based on an information network*. *Contributions to the Zoogeography and Ecology of the Eastern Mediterranean Region 1*: 399–404.
- Adler C.J., Haak W., Donlon D., Cooper A. (2011) *Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones*. *J Archaeol Sci* 38:956–964.
- Aguilar A. (1999) *Status of Mediterranean Monk Seal Populations*. Aloes Editions, Tunis.
- Aguilar A., Cappozzo L.H., Gazo M., Pastor T., Forcada J., Grau E. (2007) *Lactation and mother-pup behaviour in the Mediterranean monk seal *Monachus monachus*: An unusual pattern for a phocid*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 87, 93–99.
- Alfaghi I.E., Abed A.S., Dendrinou P., Psaradellis M., Karamanlidis A.A. (2013) *First confirmed sighting of the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) in Libya since 1972*. *Aquatic Mammals* 39: 81–84.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. e Lipman D. J. (1990) *Basic Local Alignment Search Tool*. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Androukaki E., Adamantopoulou S., Dendrinou P., Tounta E. and Kotomatas S. (1999) *Causes of mortality in the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) in Greece*. *Contributions to the Zoogeography and Ecology of the Eastern Mediterranean Region 1*: 405–411.
- Anonymous (2007b) *Status of the population of the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) in Greece*. MOm/Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk seal, Report prepared for the Hellenic Ministry for the Environment, Energy and Climate Change, Athens, Greece.
- Anonymous (2008a) *Sighting in Mallorca*. The Monachus Guardian.

<http://www.monachus-guardian.org/wordpress/2008/06/29/sighting-in-mallorca/>.

- Anonymous (2008b) *Annual technical report 2007, on the status of the Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in Greece*. Athens, Greece.
- Anonymous (2009a) *Annual technical report 2008, on the status of the Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in Greece*. Athens, Greece.
- Anonymous (2010). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. International Union for the Conservation of Nature
- Anonymous (2010b) Seal sightings in Lebanon. The Monachus Guardian. <http://www.monachus-guardian.org/wordpress/2010/09/12/seal-sightings-in-lebanon/>.
- Anonymous (2012) *Monk seal sighting in Albania*. The Monachus Guardian. <http://www.monachus-guardian.org/wordpress/2012/08/23/monk-seal-sighting-in-albania/>.
- Austin J. J., Ross A. J., Smith A. B., Fortey R. A. e Thomas, R. H. (1997) *Problems of reproducibility--does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects?* Proceedings. Biological sciences 264, 467–474.
- Azzolin M, Costantino M., Saintignan S., Pietroluongo G. (2020) *Mediterranean monk seals increased detection in the Gulf of Corinth (Greece) during CoViD-19*. IMEKO TC-19 International Workshop on Metrology for the Sea
- Badosa E., Grau E., Aparicio F., Layna J.F. and Cedenilla M.A. (1998). *Individual variation and sexual dimorphism of coloration in Mediterranean monk seal pups (Monachus monachus)*. Mar. Mamm. Sci. 14: 390–393.
- Baker J.D., Johanos T.C. (2004) *Abundance of the Hawaiian monk seal in the main Hawaiian Islands*. Biological Conservation, 116: 103-110.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. (1999) *Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies*. Mol. Biol. Evol. 16, 37–48.
- Bareham J.R. and Furreddu A. (1975) *Observations on the use of grottos by Mediterranean monk seals (Monachus monachus)*. J. Zool. 175: 291–298.
- Bayed A. (2001) *Further observations of Mediterranean monk seals on the north Atlantic coast of Morocco*. Monachus Guard. 2001, 4, 45–47.
- Beccarisi L. e Chiriaco L. (2002) *Indagine fitogeografica sulle felci delle grotte pugliesi*. Atti del III Convegno Speleologico Pugliese
- Beffagna G., Centelleghè C., Franzo G., Di Guardo. G, Mazzariol S.

- (2017) *Genomic and structural investigation on dolphin morbillivirus (DMV) in Mediterranean fin whales (Balaenoptera physalus)*. *Sci Rep.* 2017;7:41554.
- Benton M. J., Wills M. A. e Hitchin R. (2000) *Quality of the Fossil Record through Time*. *Nature* 403, 534–537.
 - Berta et al., 2011. *Marine mammals evolutionary biology*. Academic Press.
 - Blanc G.A. (1930) *Grotta Romanelli. II. Dati ecologici e paleontologici*. *Atti della I Riunione dell'Istituto Italiano di Paleontologia Umana* 365e518.
 - Blanco J.C. (1998) *Mamíferos De Espana. I. Insectívoros, Quiropteros, Primates y Carnívoros de la Península Iberica, Baleares y Canarias*, Barcelona.
 - Borrell A., Aguilar A. and Pastor T. (1997) *Organochlorine pollutant levels in Mediterranean monk seals from the western Mediterranean and the Sahara Coast*. *Mar. Pollut. Bull.* 34: 505–510.
 - Borrell A., Cantos G., Aguilar A., Androukaki e. and Dendrinis P. (2007) *Concentrations and patterns of organochlorine pesticides and PCBs in Mediterranean monk seals (Monachus monachus) from Western Sahara and Greece*. *Sci. Total. Environ.* 381: 316–325.
 - Brito C. (2012) *Portuguese sealing and whaling activities as contributions to understand early northeast Atlantic environmental history of Marine mammals*. In: Romero A, Keith EO (eds) *New Approaches to the Study of Marine Mammals*, 207–222. InTech, [dx.doi.org/10.5772/54213](https://doi.org/10.5772/54213).
 - Bundone L. (2016) *Piano di valutazione e conservazione della foca monaca Monachus monachus in Aree a Bassa Densità nel Mediterraneo*
 - Bundone L., Fai S., D'Ambrosio P., Onorato R., Minonne F., Molinaroli E. (2014) *Coastal habitat availability for the Mediterranean monk seal, Monachus monachus (Hermann, 1779), in Salento: Preliminary results*. *Biol. Mar. Mediterr.* 21, 253–254.
 - Bundone L., Panou A., Molinaroli E. (2019) *On sightings of (vagrant?) monk seals, Monachus monachus, in the Mediterranean Basin and their importance for the conservation of the species*. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 29, 554–563.
 - Burgess H.K., DeBey L.B., Froehlich H.E. et al. (2017) *The science of citizen science: exploring barriers to use as a primary research tool*. *Biol Conserv* 208:113–120.
 - Casas-Marce, Marmesat M. E., Soriano L. et al. (2017). *Spatiotemporal dynamics of genetic variation in the Iberian lynx along its path to*

- extinction reconstructed with ancient DNA*. Molecular Biology and Evolution 34:2893–2907.
- Centelleghes C., Beffagna G., Zanetti R., Zappulli V., Di Guardo G., Mazzariol S. (2016) *Molecular analysis of dolphin morbillivirus: A new sensitive detection method based on nested RT-PCR*. J Virol Methods. 2016;235:85–91.
 - Cigliano J.A., Meyer R., Ballard H.L. et al. (2015) *Making Marine and coastal citizen science matter*. Ocean Coast Manage 115:77–87.
 - Cohn J.P. (2008) *Citizen Science: Can Volunteers Do Real Research?* BioScience, Volume 58, Issue 3, Pages 192–197
 - Cooper A., Lalueza-Fox C., Anderson S., Rambaut A., Austin J. e Ward, R. (2001b) *Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution*. Nature 409, 704–707.
 - Coppola E. (2003) *Another seal sighting in Puglia*. Mediterranean News. The Monachus Guardian, 6(1): 19.
 - Coppola E. (2005) *Summer sightings at Orosei*. Mediterranean News, The Monachus Guardian, 8(2): 12.
 - Crall A.W., Jordan R., Holfelder K., Newman G., Graham J., Waller D.M. (2012) *The impacts of an invasive species citizen science training program on participant attitudes, behaviour and science literacy*. Public Underst. Sci. 22, 745–764.
 - Danielsen F., Burgess N.D., Jensen P.M., Pirhofer-Walzl K. (2010) *Environmental monitoring: the scale and speed of implementation varies according to the degree of people’s involvement*. J. Appl. Ecol. 47, 1166–1168.
 - Danyer E., Aytemiz I., Cemal Gücü A. and Tonay A. M. (2014) *Preliminary study on a stranding case of Mediterranean monk seal Monachus monachus (Hermann, 1779) on the Eastern Mediterranean coast of Turkey*. Journal of Black Sea/Mediterranean Environment 20:152–157.
 - Danyer E., Aytemiz I., Özgür Özbek E. and Tonay A.M. (2013) *Preliminary study on a stranding case of Mediterranean monk seal Monachus monachus (Hermann, 1779) on Antalya coast, Turkey, August 2013*. Journal of Black Sea/Mediterranean Environment 19:359-364.
 - Dayon J., Lecompte E., Aguilar A. et al. (2020) *Development and characterization of nineteen microsatellite loci for the endangered Mediterranean monk seal Monachus monachus*. Mar. Biodiv. 50, 1–7
 - De Waele J., Brook G. A. e Oertel A. (2009) *Monk seal (Monachus monachus) bones in Bel Torrente cave (Central-East Sardinia) and their paleogeographical significance*. Journal of Cave and Karst Studies,

71(1), 16-23.

- Dean M. D. e Ballard J. W. O. (2001) *Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98, 279–283.
- Dede A., Tonay M.A. e Öztürk B. (2015). *Mediterranean monk seal Monachus monachus (Hermann, 1779) in the Aegean Sea*. Pages 612–636 in T. Katagan, A. Tokaç, S. Besiktepe and B. Öztürk, eds. *The Aegean sea marine biodiversity: Fisheries, conservation and governance*. Publication No. 41. Turkish Marine Research Foundation, Istanbul, Turkey.
- Dee Boersma P., Kareiva P., Fagan W. F., Alan Clark J. e Hoekstra J. M. (2001). *How good are endangered species recovery plans? The effectiveness of recovery plans for endangered species can be improved through incorporation of dynamic, explicit science in the recovery process, such as strongly linking species' biology to recovery criteria*. *BioScience*, 51(8), 643-649.
- Dendrinou P., Adamantopoulou S., Tounta E., Karamanlidis A. (2017) *The uncertain fate of the endangered Mediterranean Monk Seal Monachus monachus in the 21st century*. *Tropical Pinnipeds* 219-233.
- Dendrinou P., Karamanlidis A.A., Kotomatas S., Paravas V., Adamantopoulou S. (2008) *Report of a new Mediterranean monk seal (Monachus monachus) breeding colony in the Aegean Sea, Greece*. *Aquatic Mammals* 34: 355–361.
- Dendrinou, P. (2011) *Contribution to the study of the Mediterranean monk seal's (Monachus monachus) ecology and biology at the island complex of Northern Sporades, Greece*. National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.
- Di Sciara G.N., Fouad M. (2012) *Monk seal sightings in Egypt*. The Monachus Guardian. <http://www.monachus-guardian.org/wordpress/category/med-monk-seal/mediterranean-news/egypt/>.
- Di Turo P. (1984) *Presenza della foca monaca (Monachus monachus) nell'area mediterranea con particolare riferimento alla Puglia*. *Thalassia Salentina*, 14, 66-84.
- Earp H. S. e Liconti A. (2020) *Science for the future: the use of citizen science in Marine research and conservation*. in *YOUMARES 9-The Oceans: Our Research, Our Future*, eds S. Jungblut, V. Liebich, e M. Bode-Dalby (Cham: Springer), 1–19
- Eglinton G., Logan G.A. (1991) *Molecular preservation*. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 333:315–27; discussion 27–28

- Fernandez de Larrinoa P., Munoz M., M'Barek H. (2007) *They're back!!! Monk seal reoccupy lost habitats on Cabo Blanco peninsula. The Monachus Guardian.* <http://www.monachus-guardian.org/mguard20/2015mednew.htm> #MauritaniaWesternSahara.
- Fioravanti T., Splendiani A., Righi T., Maio N., Lo Brutto S. et al. (2020) *A Mediterranean monk seal pup on the Apulian Coast (Southern Italy): Sign of an ongoing recolonisation?* Diversity, 12, 258.
- Forcada J., Aguilar A. (2000) *Use of photographic identification in capture-recapture studies of Mediterranean monk seals.* Marine Mammal Science 16: 767–793.
- Forcada J., Hammond P.S., Aguilar A. (1999) *Status of the Mediterranean monk seal Monachus monachus in the western Sahara and the implications of a mass mortality event.* Marine Ecology Progress Series 188: 249–261.
- Formigaro C., Karamanlidis A. A., Dendrinou P., Marsili L., Silvi M. and Zaccaroni A. (2016) *Trace element concentrations in the Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in the Eastern Mediterranean Sea.* Science of the Total Environment 576: 528–537.
- Frankham R. (1995) *Inbreeding and extinction: a threshold effect.* Conservation Biology 9: 792–799.
- Frankham R. 2005. *Genetics and extinction.* Biological Conservation 126:131–140
- Frankham R., Ballou J. D. e Briscoe D. A. (2002) *Introduction to conservation genetics.* Cambridge University Press
- Fritz S. et al. (2019) *Citizen science and the United Nations sustainable development goals.* Nat. Sustain. 2, 922–930.
- Fyler C. A., Reeder T. W., Berta A., Antonelis G., Aguilar A. e Androukaki E. (2005) *Historical biogeography and phylogeny of monachine seals (Pinnipedia: Phocidae) based on mitochondrial and nuclear DNA data.* Journal of Biogeography, 32(7), 1267-1279.
- Galetti M. e Dirzo R. (2013). *Ecological and evolutionary consequences of living in a defaunated world.* Biological Conservation, 163, 1-6.
- Garcia-Soto C., van der Meeren G.I., Busch J.A. et al. (2017) *Advancing citizen science for coastal and ocean research.* In: French V., Kellett P., Delany J. et al. (eds) Position Paper 23 of the European Marine Board, Ostend, Belgium
- Garrod D.A.E., Buxton L.H.D., Smith G.E., Bate D.M.A. (1928) *Excavation of a mousterian rock-shelter at Devil's tower, Gibraltar.* J. R. Anthropological Inst. LVIII 33e113.
- Garza J.C. e Williamson E. (2001) *Detection of reduction in population*

- size using data from microsatellite loci. Mol. Ecol. 10, 305-318*
- Gaubert P., Justy F., Mo G., Aguilar A., Danyer E. et al. (2019) *Insights from 180 years of mitochondrial variability in the endangered Mediterranean monk seal (Monachus monachus)*. Mar. Mamm. Sci. 35, 1489–151140. Frankham, R. Genetics and extinction. Biol. Conser.
 - Gilbert M.T.P., Willerslev E., Hansen A.J., Barnes I., Rudbeck L., Lynnerup N., Cooper A. (2003) *Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA*. Am J Hum Genet 72:32–47
 - Gomercić T., Huber Đ., Đuras Gomercić M., Gomercić H. (2011) *Presence of the Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in the Croatian part of the Adriatic Sea*. Aquatic Mammals 37: 243–247.
 - Gonzalez L.M. (1999) *Foca monje del Mediterraneo, Monachus monachus (Hermann, 1779)*. Galemys 11 (1), 3e16.
 - González L.M. (2015) *Prehistoric and historic distributions of the critically endangered Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in the eastern Atlantic*. Marine Mammal Science 31: 1168–1192.
 - González L.M., Fernandez de Larrinoa P. (2012) *Mediterranean monk seal Monachus monachus distribution and fisheries interactions in the Atlantic Sahara during the second half of the 20th century*. Mammalia 77: 41–49.
 - Grunenwald A., Keyser C., Sautereau A. M., Crubézy E., Ludes B. e Drouet, C. (2014) *Novel contribution on the diagenetic physicochemical features of bone and teeth minerals, as substrates for ancient DNA typing*. Analytical and bioanalytical chemistry, 406(19), 4691-4704.
 - Güçlüsoy H. e Savaş Y. (2003a) *Interaction between monk seals Monachus monachus (Hermann, 1779) and Marine fish farms in the Turkish Aegean and the management of the problem*. Aquacult. Res. 34: 777–783.
 - Güçlüsoy H., Kiraç C.O., Veryeri N.O., Savas, Y. (2004) *Status of the Mediterranean monk seal, Monachus monachus (Hermann, 1779) in the coastal waters of Turkey*. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences 21: 201–210.
 - Güçlüsoy, H. (2008) *Damage by monk seals to gear of the artisanal fishery in the Foça monk seal pilot conservation area, Turkey*. Fish Res. 90: 70–77.
 - Gücü A.C., Gücü G. and Orek H. (2004) *Habitat use and preliminary demographic evaluation of the critically endangered Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in the Cilician Basin (Eastern Mediterranean)*. Biological Conservation 116: 417–431.
 - Gücü A.C., Ok M., Sakinan S. (2009b) *A survey of the critically*

- endangered Mediterranean monk seal, Monachus monachus (Hermann, 1779) along the coast of Northern Cyprus. Israel Journal of Ecology and Evolution 55: 77–82.*
- Gücü, A.C., Sakinan S. e Ok M. (2009) *Occurrence of the critically endangered Mediterranean monk seal, Monachus monachus, at Olympos-Beydaglari National Park, Turkey. Zool. Middle East 46: 3–8.*
 - Hairr J. (2001) *Caribbean monk seals lost seals of the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. Coachwhip Publications, Landisville, Pennsylvania: 190 pp.*
 - Haklay M. (2015) *Citizen science and policy: a European perspective. The Woodrow Wilson Center, Washington, DC.*
 - Hale R., Pires R., Santos P. e Karamanlidis A.A. (2011) *Mediterranean monk seal (Monachus monachus): Fishery interactions in the Archipelago of Madeira. Aquat. Mamm. 37: 298–304.*
 - Hall T.A. (1999) *BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 1999, 41, 95–98.*
 - Handt O., Hoss M., Krings M. e Paabo S. (1994) *Ancient DNA: methodological challenges. Experientia 50, 524–529*
 - Handt O., Krings M., Ward R. H. e Pääbo S. (1996) *The retrieval of ancient human DNA sequences. Am. J. Hum. Genet. 59, 376–386.*
 - Harwood J., Stanley H., Beudels M.-O. e Vanderlinden C. (1996) *Metapopulation dynamics of the Mediterranean Monk Seal. Pages 241–257 in D. Mccullough, ed. Metapopulations and wildlife conservation. Island Press, Covelo, CA.*
 - Henderson R.J., Kalogeropoulos N., Alexis M.N. (1994) *The lipid composition of selected tissues from a Mediterranean monk seal, Monachus monachus. Lipids 29, 577e582.*
 - Hernández M., Robinson I., Aguilar A., Gonzalez L.M, Lopez-Jurado L.F., Reyero M.I. et al. (1998) *Did algal toxins cause monk seal mortality? Nature 393: 28–29.*
 - Higgins D., Austin J.J. (2013) *Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. Sci Justice 53:433–441.*
 - Hoffmann M., Hilton-Taylor C., Angulo A., Böhm M., Brooks T. M., Butchart, S. H. et al. (2010). *The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. science, 330(6010), 1503-1509.*
 - Hofreiter M., Serre D., Poina, H. N., Kuch M. e Pääbo S. (2001b) *Ancient DNA. Nature Rev. Genet. 2, 353–360.*
 - Höss M., Jaruga P., Zastawny T. H., Dizdaroglu M. & Paabo S. (1996) *DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. Nucleic*

- Acids Res. 24, 1304–1307.
- Hyder K., Townhill B., Anderson L.G., Delany J., Pinnegar J.K. (2015) *Can citizen science contribute to the evidence-base that underpins Marine policy?* Marine Policy 59, 112–120.
 - Inanmaz O.E., Degirmenci O., Gucu A.C. (2014) *A new sighting of the Mediterranean monk seal, Monachus monachus (Hermann, 1779), in the MarMara Sea (Turkey).* Zoology in the Middle East 60: 278–280.
 - Israëls L.D.E. (1992) *Thirty years of Mediterranean monk seal protection – a review.* Mededelingen 28: 1–65.
 - Jarvis R.M., Bollard Breen B., Krägeloh C.U., Billington D.R. (2015) *Citizen science and the power of public participation in Marine spatial planning.* Mar. Policy 57, 21–26.
 - Johnson W. E., Godoy J. A., Palomares F., Delibes M., Fernandes M., Revilla E. e O'Brien S. J. (2004). *Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations.* Journal of Heredity 95:19–28.
 - Johnson W.M. (2004) *Monk seals in post-classical history. The role of the Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in European history and culture, from the fall of Rome to the 20th century.* Mededelingen 39: 1–91.
 - Johnson W.M. e Karamanlidis A.A. (2000) *When fishermen save seals.* The Monachus Guardian 3: 18–22.
 - Johnson W.M., Karamanlidis A.A., Dendrinis P., de Larrinoa P.F., Gazo M., Gonzalez L.M., Güçlüsoy H., Pires R., Schnellmann M. (2006) *Monk Seal Fact Files. Biology, Behaviour, Status and Conservation of the Mediterranean monk seal, Monachus monachus.* The Monachus Guardian. <http://www.monachus-guardian.org/factfiles/medit01.htm>.
 - Johnson W.M., Lavigne D.M. (1999a) *Monk seals in antiquity. The Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in ancient history and literature.* Mededelingen 35: 1–101.
 - Karamanlidis A. A., Gaughran S., Aguilar A., et al. (2016b) *Shaping species conservation strategies using mtDNA analysis: The case of the elusive Mediterranean monk seal (Monachus monachus).* Biological Conservation 193:71–79.
 - Karamanlidis A. A., Skrbinšek T., Amato G., Dendrinis P., Gaughra S., Kasapidis P. et al. (2021). *Genetic and demographic history define a conservation strategy for earth's most endangered pinniped, the Mediterranean monk seal Monachus monachus.* Scientific reports, 11(1), 1-10.
 - Karamanlidis A.A. and Dendrinis P. (2015) *Monachus monachus.* In: The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T13653A45227543.

- Karamanlidis A.A., Amato G., Dendrinos P., Gaughran S., Hersch R., Psaradellis M., Schultz J., Skrbinek T. (2014b) *Genetic status of the critically endangered Mediterranean monk seal (Monachus monachus): development of a genetic research protocol and preliminary assessment of the status of the species in the eastern Mediterranean Sea*. MOM/Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk seal, Final report grant awarded by the Marine Mammal Commission (USA), Athens, Greece.
- Karamanlidis A.A., Androukaki E., Adamantopoulou S., Chatzisprou A., Johnson W.M., Kotomatas S. et al. (2008) *Assessing accidental entanglement as a threat to the Mediterranean monk seal Monachus monachus*. *Endang. Species Res.* 5: 205–213.
- Karamanlidis A.A., Dendrinos P., Fernandez de Larrinoa P. et al. (2016a) *The Mediterranean monk seal Monachus monachus: status, biology, threats, and conservation priorities*. *Mammal Rev* 46:92-105.
- Karamanlidis A.A., Paravas V., Trillmich F., Dendrinos P. (2010) *First observations of parturition and postpartum behavior in the Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in the eastern Mediterranean*. *Aquat. Mamm.* 36, 27–32.
- Kelly R., Fleming A., Pecl G., von Gönner J. and Bonn A. (2020) *Citizen science and Marine conservation: a global review* *Phil. Trans. R. Soc.* B3752019046120190461
- King J.E. (1956) *The monk seals (Genus Monachus)*. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.*, London 3: 201–256, 208 pls.
- Kiraç C.O. (1998) *Oil Spill at Cavus Island*. *The Monachus Guardian* 1: 16–18.
- Kiraç C.O. (2011) *Conservation of the Mediterranean monk seal Monachus monachus in Turkey and the role of coastal and Marine protected areas*. In: Hoyt E (ed) *Proceedings of the Second International Conference on Marine Mammal Protected Areas*, 41. Agency des Aires Marines Proteges, France & NOAA, USA, Fort-de-France, Martinique.
- Kiraç C.O., Ok M. (2019) *Diet of a Mediterranean monk seal Monachus monachus in a transitional post-weaning phase and its implications for the conservation of the species*. *Endanger. Species Res.* 39, 315–320.
- Kiraç C.O., Savas Y. (1996) *Status of the monk seal (Monachus monachus) in the neighborhood of Ereğli, Black Sea coast of Turkey*. *Zoology in the Middle East* 12: 5–12.
- Kiraç C.O., Veryeri N.O., Güçlüsoy H., Savas Y. (2013) *National Action Plan for the Conservation of the Mediterranean monk seal Monachus monachus in Turkey*. UNEP MAP RAC/SPA and Republic of Türkiye

Ministry of Forest and Water Works, Ankara, Turkey.

- Kullenberg C., Kasperowski D. (2016) *What is citizen science? A scientometric meta-analysis*. PLoS One 11(1):e0147152.
- Lacy R. C. (1997) *Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations*. J. Mammal. 78, 320–335.
- Lande, R. (1998). *Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation*. Researches on Population Ecology 40:259–269
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., Mcgettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., et al. (2007) *ClustalWand Clustal X version 2.0*. Bioinformatics 23, 2947–2948.
- Layna J.E., Cedenilla M.A., Aparicio F. and Gonzalez L.M. (1999) *Observations of parturition in the Mediterranean monk seal (Monachus monachus)*. Mar. Mamm. Sci. 15: 879–882.
- Leonard J. A. (2008). *Ancient DNA applications for wildlife conservation*. Molecular Ecology, 17(19), 4186–4196.
- Lindahl T. (1993) *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature, 362, 709–715
- Ling J.K. (1970) *Pelage and molting in wild mammals with special reference to aquatic forms*. Q. Rev. Biol. 45: 16–54.
- Luikart G.L., Allendorf F.W., Cornuet J.-M. and Sherwin W.B. (1998) *Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks*. J. Hered. 89, 238–247
- Mammiferi Marini del Mediterraneo – Storia Naturale, Giulia Mo (2005).
- Lyman R.L., Savelle J.M., Whitridge P. (1992) *Derivation and application of a meat utility index for Phocid Seals*. J. Archaeol. Sci. 19, 531–555.
- MacHugh D. E., Edwards C. J., Bailey J. F., Bancroft D. R. e Bradley, D. G. (2000). *The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies*. Ancient Biomolecules, 3(2), 81–103.
- Marchessaux D. (1989) *Distribution and status of the monk seal population Monachus monachus (Hermann, 1779)*. Mammalia 53, 621–642
- Marchessaux, D. and Pergent-Martini C. (1991) *Biologie de la production et développement des nouveaux nés chez le phoque moine Monachus monachus*. pp. 349–358. In: C.F. Boudouresque, M. Avon and V. Gravez [eds.]. Les Espèces Marines à Protéger en Méditerranée. GIS Posidonie Publ., Marseille, France.

- Martínez-Jauregui M., Tavecchia G., Cedenilla M.A., Coulson T., Fernández de Larrinoa P., Muñoz M., González L.M. (2012) *Population resilience of the Mediterranean monk seal Monachus monachus at Cabo Blanco peninsula*. Marine Ecology Progress Series 461: 273–281.
- Matear L., Robbins J.R., Hale M., Potts J. (2019) *Cetacean biodiversity in the Bay of Biscay: suggestions for environmental protection derived from citizen science data*. Mar. Policy 109, 103672.
- Matocq M. D. e Villablanca F.X. (2001). *Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern?* Biological Conservation 98:61–68.
- McKinley D.C. et al. (2017) *Citizen science can improve conservation science, natural resource management and environmental protection*. Biol. Conserv. 208, 15–28.
- Mo G. (2011) *Mediterranean monk seal (Monachus monachus) sightings in Italy (1998–2010) and implications for conservation*. Aquatic Mammals 37: 236–240.
- Mo G., Bazairi H., Bayed A., Agnesi S. (2011) *Survey on Mediterranean monk seal (Monachus monachus) sightings in Mediterranean Morocco*. Aquatic Mammals 37:248–255.
- Morales-Pérez J. V., Ripoll M. P., Pardo J. J., Álvarez-Fernández E., González A. M. e Tortosa J. A. (2019) *Mediterranean monk seal hunting in the regional Epipalaeolithic of Southern Iberia. A study of the Nerja Cave site (Málaga, Spain)*. Quaternary International, 515, 80-91.
- Morales-Pérez J.V., Pérez Ripoll M., Jordá Pardo J.F., Álvarez-Fernández E., Maestro González A., Aura Tortosa J.E. (2019) *Mediterranean monk seal hunting in the regional Epipalaeolithic of Southern Iberia. A study of the Nerja Cave site (Málaga, Spain)*. Quat. Int. 2019, 515, 80–91.
- Murphy, G. E. e Romanuk, T. N. (2014) *A meta-analysis of declines in local species richness from human disturbances*. Ecol. Evol. 4, 91–103.
- Mursaloglu B. (1964) *Occurrence of the monk seal on the Turkish coasts*. Journal of Mammalogy 45: 316–317.
- Notarbartolo di Sciara G. (2013) *Draft regional strategy for the conservation of monk seals in the Mediterranean (2014–2019)*. Tethys Research Institute, Milano, Italy
- Notarbartolo di Sciara G., Adamantopoulou S., Androukaki E., Dendrinou P., Karamanlidis A.A., Paravas V. et al. (2009) *National strategy and action plan for the conservation of the Mediterranean monk seal in Greece, 2009–2015*. MOM/ /Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk seal. Athens, Greece.

- Nursey-Bray M., Palmer R., Pecl G.T. (2018) *Spot, log, map: assessing a Marine virtual citizen science program against Reed's best practice for stakeholder participation in environmental management*. *Ocean Coast. Manage.* 15, 1–9.
- Osterhaus A., Van De Bildt M., Vedder L., Martina B., Niesters H., Vos J., Van Egmond H., Liem D., Baumann R., Androukaki E. et al. (1998) *Monk seal mortality: Virus or toxin? Vaccine*, 16, 979–981.
- Osterhaus A.D.M.E., Visser I.K.G., de Swart R.L., van Bresse M.F., van de Bildt M.W G., Oervell C. et al. 1992. *Morbillivirus threat to Mediterranean monk seals? Vet. Rec.* 130: 141–142.
- Pääbo S. e Wilson A. C. (1988) *Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts*. *Nature* 334, 387–388.
- Pääbo S., Higuchi R. G. e Wilson A. C. (1989) *Ancient DNA and the polymerase chain reaction*. *J. Biol. Chem.* 264, 9709–9712.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Després V., Hebler J., Rohland, N. et al. (2004) *Genetic analyses from ancient DNA*. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 645-679.
- Panou A. *Monk seal sightings in the central Ionian Sea. A network of fishermen for the protection of the marine resources*. In *Proceedings of the European Cetacean Society Annual Conference, Istanbul, Turkey, 28 February 2009*; p. 6.
- Panou A., Jacobs J., Panos D. (1993) *The endangered mediterranean monk seal *Monachus monachus* in the Ionian Sea, Greece*. *Biol. Conserv.* 64, 129–140.
- Pastor T. and Aguilar A. (2003) *Reproductive cycle of the female Mediterranean monk seal in the western Sahara*. *Mar. Mamm. Sci.* 19: 318–330.
- Pastor T., Garza J.C., Aguilar A., Tounta E., Androukaki E. (2007) *Genetic diversity and differentiation between the two remaining populations of the critically endangered Mediterranean monk seal*. *Animal Conservation* 10: 461–469.
- Pastor T., Garza J.C., Allen P., Amos W., Aguilar A. (2004) *Low genetic variability in the highly endangered Mediterranean monk seal*. *Journal of Heredity* 95: 291–300.
- Pecl G.T. et al. (2019) *Redmap Australia: challenges and successes with a large-scale citizen sciencebased approach to ecological monitoring and community engagement on climate change*. *Front. Mar. Sci.* 6, 349.
- Petrella A., Mazzariol S., Padalino I., Di Francesco G. et al. (2021) *Cetacean Morbillivirus and *Toxoplasma gondii* Co-infection in Mediterranean Monk Seal Pup, Italy*. *Emerg Infect Dis.* 2021

Apr;27(4):1237-1239.

- Pires R. (2011) *Lobos-Marinheiros do arquipélago da Madeira*, Edições do Serviço do Parque Natural da Madeira, Funchal, Madeira
- Pires R., Neves H.C., Karamanlidis A.A. (2008) *The critically endangered Mediterranean monk seal *Monachus monachus* in the archipelago of Madeira: priorities for conservation*. Oryx 42: 278–285.
- Pires R.M., Neves H.C. (2000c) *Monk seal sightings on open beaches in Desertas Islands – Madeira Archipelago*. The Monachus Guardian 3: 70–71.
- Poinar H. N. e Cooper A. (2000) *Ancient DNA: do it right or not at all*. Science, 5482(1139), 416.
- Pääbo S. (1989) *Ancient DNA; extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 86, 1939–1943
- Ramakrishnan U., Hadly E.A., Mountain J.L. (2005) *Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data*. Molecular Ecology, 14, 2915–2922.
- Reijnders P., Brasseur S., van der Torn J., van der Wolf P., Boyd I., Harwood J., Lavigne D. e Lowry L. [eds.]. (1993) *Seals, Fur Seals, Sea Lions and Walrus. Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland, Switzerland.
- Reimer P. J., Baillie M. G., Bard E., Bayliss A., Beck J. W., Blackwell P. G. et al. (2009). *IntCal09 and Marine09 radiocarbon age calibration curves, 0–50,000 years cal BP*. Radiocarbon, 51(4), 1111-1150.
- Reyero M., Cacho E., Martinez A., Vazquez J., Marina A., Fraga S. et al. (2000) *Evidence of saxitoxin derivatives as causative agents in the 1997 mass mortality of monk seals in the Cape Blanc Peninsula*. Nat. Toxins 8: 1–5.
- Roditi-Elasar M., Bundone L., Goffman O., Scheinin A. P. e Kerem, D. H. (2021). *Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) sightings in Israel 2009–2020: Extralimital records or signs of population expansion?..Marine Mammal Science, 37(1), 344-351.*
- Rodriguez R., Ramirez O., Valdiosera C. E. et al. (2011). *50,000 years of genetic uniformity in the critically endangered Iberian lynx*. Molecular Ecology 20:3785–3795.
- Rosel P. E. e Rojas-Bracho L. (1999). *Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* Norris and MacFarland, 1958*. Marine Mammal Science 15:990–1003.
- Rosenbaum H. C., Egan M. G., Clapham P. J. et al. (2000) *Utility of North Atlantic right whale museum specimens for assessing changes in genetic*

- diversity*. Conservation Biology 14:1837–1842.
- Roy H.E., Pocock M.J., Preston C.D. et al. (2012) *Understanding citizen science and environmental monitoring: final report on behalf of UK-EOF*. NERC Centre for Ecology & Hydrology and Natural History Museum, London, pp 1–170.
 - Said M. Y. et al. (2016) *Effects of extreme land fragmentation on wildlife and livestock population abundance and distribution*. J. Nat. Cons. 34, 151–164.
 - Scheel D.M., Slater G.J., Kolokotronis S.O., Potter C.W., Rotstein D.S., et al. (2014). *Biogeography and taxonomy of extinct and endangered monk seals illuminated by ancient DNA and skull morphology*. Research Article, ZooKeys, 409: 1-33.
 - Scheinin A.P., Goffman O., Elasar M., Perelberg A., Kerem D.H. (2011) *Mediterranean monk seal (Monachus monachus) resighted along the Israeli coastline after more than half a century*. Aquatic Mammals 37: 241–242.
 - Serangeli i Dalmau J. (2001) *La zona de costa en Europa durante la última glaciación* In: *Consideraciones al análisis de restos y representaciones de focas, cetáceos y algas gigantes*. Cypsela: revista de prehistoria i protohistoria 13, pp. 123e136.
 - Sergeant D., Ronald K, Boulva J. e Berkes F. (1978). *The recent status of Monachus monachus, the Mediterranean monk seal*. Biological Conservation 14:259–287
 - Shapiro R. (1981) *Damage to DNA caused by hydrolysis*. In Chromosome Damage and Repair, ed. E Seeberg, K Kleppe, pp. 3–12. New York: Plenum
 - Silvertown J. (2009) *A new dawn for citizen science*. Trends Ecol Evol 24(9):467–471.
 - Smith C. I., Chamberlain A. T., Riley M. S., Cooper A., Stringer C. B. e Collins M. J. (2001) *Neanderthal DNA: not just old but old and cold?* Nature 10, 771–772
 - Smith I. (2005) *Retreat and resilience: fur seals and human settlement in New Zealand*. In: Monks, G.G. (Ed.), *The Exploitation and Cultural Importance of the Sea Mammals*. Oxbow books, Oxford, pp. 6e18.
 - Sonneville-Bordes D.d., Laurent P. (1983) *Le phoque à la fin des temps glaciaires*. In: Poplin, F. (Ed.), *La Faune et l'Homme préhistorique*, Paris, pp. 69e80.
 - Speller C.F., Yang D.Y., Hayden B. (2005) *Ancient DNA investigation of prehistoric salmon resource utilization at Keatley Creek, British Columbia, Canada*. J. Archaeol. Sci. 32 (9), 1378–1389.

- Spielman D., Brook B. W. and Frankham R. (2004). *Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:15261–15264
- Steele T.E. e Alvarez-Fernández E. (2011). *Initial investigations into the exploitation of coastal resources in North Africa during the Late Pleistocene at Grotte des Contrebandiers, Morocco*. Pages 383–403 in N. F. Bicho, J. A. Haws and L. G. Davis, eds. *Trekking the shore: Changing coastlines and the antiquity of coastal settlement*. Springer, New York, NY.
- Stringer C.B., Finlayson J.C., Barton R.N.E., Fernández-Jalvo Y., Cáceres I., Sabin R.C., Rhodes E.J., Currant A.P., Rodríguez-Vidal J., Giles-Pacheco F. et al. (2008) *Neanderthal exploitation of Marine mammals in Gibraltar*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 14319–14324.
- Such M. (1920) *Avance al estudio de la caverna del Hoyo de la Mina (Malaga)*. Bol. La Soc. Malagueña Ciencias.
- Theobald E.J., Ettinger A.K., Burgess H.K. et al. (2015) *Global change and local solutions: tapping the unrealized potential of citizen science for biodiversity research*. Biol Conserv 181:236–244.
- Thomas R. H., Schaffner W., Wilson A. C. e Pääbo S. (1989) *DNA phylogeny of the extinct Marsupial wolf*. Nature 340, 465–467.
- Turrini T., Dörler D., Richter A., Heigl F., Bonn A. (2018) *The threefold potential of environmental citizen science—generating knowledge, creating learning opportunities and enabling civic participation*. Biol. Conserv. 225,
- UNEP (2005) *Action plan for the recovery of the Mediterranean monk seal (Monachus monachus) in the eastern Atlantic*. Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals (Bonn Convention) CMS/ScC.13/Inf.3.
- van de Bildt M.W.G., Vedder E.J., Martina B.E.E., Abou Sidib B., Jiddou A.B., Barham M.E.O. et al. (1999) *Morbilliviruses in Mediterranean monk seals*. Vet. Microbiol. 69: 19–21.
- Wandeler P., Hoeck P. E. A. e Keller L. F. (2007). *Back to the future: Museum specimens in population genetics*. Trends in Ecology & Evolution 22:634–642.
- Warner K.A., Lowell B., Timme W., Shaftel E., Hanner R.H. (2019) *Seafood sleuthing: how citizen science contributed to the largest Market study of seafood mislabeling in the US and informed policy*. Marine Policy 99, 304–311.
- Weber D., Stewart B. S., Garza J. C. e Lehman N. (2000). *An empirical*

genetic assessment of the severity of the northern elephant seal population bottleneck. Current Biology 10:1287–1290.

- Willerslev E. e Cooper A. (2005) *Ancient DNA.* Proc. Biol. Sci.272,3–16.
- Willerslev E., Hansen A. J. e Poinar H. N. (2004b) *Isolation of nucleic acids and cultures from ice and permafrost.* Trends Ecol. Evol. 19, 141–147.
- Worm B., Barbier E.B., Beaumont N., Duffy J.E. et al. (2006). *Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services.* Science 314, 787 LP – 790.
- Yang D. Y. and Watt K. (2005) *Contamination Controls When Preparing Archaeological Remains for Ancient DNA Analysis.* Journal of Archaeological Science 32, 331–336.
- Yang D.Y., Eng B., Wayne J.S., Dудар J.C., Saunders S.R. (1998) *Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns.* Am J Phys Anthropol 105:539–543.
- Yazici, Z., Otürk B. (1996) *Fatty acids in the blubber of the Mediterranean monk seal, Monachus monachus (Hermann, 1779).* Turkish J. Mar. Sci. 2, 177e183
- Yediler A., Panou A. and Schramel P. (1993) *Heavy metals in hair samples of the Mediterranean monk seal (Monachus monachus).* Mar. Pollut. Bull. 26: 156–159.
- Zettler E.R., Takada H., Monteleone B., Mallos N., Eriksen M., Amaral-Zettler L.A. (2017) *Incorporating citizen science to study plastics in the environment.* Anal. Methods 9, 1392–1403.