

Inhaltsverzeichnisse verfügbar bei [ScienceDirect](#)

Zeitschrift für Archäologische Wissenschaft: Berichte

Homepage der Zeitschrift: www.elsevier.com/locate/jasrep

Die Geheimnisse des Sobek - Das Mitogenom einer Krokodilmumie aus dem alten Ägypten

Evon R. Hekkalaa,^{c,*}, Matthew L. Aardemab,^c, Apurva Narechaniac, George Amato^c,

Salima Ikram^d, Matthew H. Shirley^e, Kent A. Vliet^f, Seth W. Cunninghama,^c,

M. Thomas P. Gilbert^g, Oliver Smith^{g,h}

^a Fordham University, Department of Biological Sciences, Bronx, NY 10458, USA

^b Abteilung für Biologie, Montclair State University, Montclair, NJ 07043, USA

^c Sackler Institute for Comparative Genomics, American Museum of Natural History, New York, NY 10024, USA

^d Abteilung für Soziologie, Ägyptologie und Anthropologie, Amerikanische Universität in Kairo, Kairo, Ägypten

^e Institut für Umwelt, Florida International University, North Miami, FL 33181, USA

^f Department of Biology, University of Florida, Gainesville, FL, USA

^g Abteilung für evolutionäre Genomik, The Globe Institute, Universität Kopenhagen, Dänemark

^h Micropathology Ltd, University of Warwick Science Park, Coventry, UK

ARTICLE INFO

Stichworte:

Antike DNA

Crocodylus niloticus

Crocodylus suchus

Tier Mumien

ABSTRACT

Bisherige Untersuchungen zur genetischen Vielfalt im Verbreitungsgebiet des Nilkrokodils (*Crocodylus niloticus*)

bestätigte die Existenz von zwei genetisch unterschiedlichen Arten von echten Krokodilen (Gattung *Crocodylus*) in Afrika. Diese

Taxa entsprechen in etwa einer östlichen/südlichen afrikanischen Art (*Crocodylus niloticus*) und einer zentralen/westlichen

afrikanische Art (*Crocodylus suchus*). Die Analyse von historischen Museumsexemplaren zeigte, dass beide Arten

existierte im sudanesischen Nil bis ins frühe 20. Jahrhundert gleichzeitig und genetische Analysen von historischen Museums

Exemplare mumifizierter Krokodilschlüpflinge aus ägyptischen Gräbern, die entlang des ägyptischen Nils gefunden wurden, wurden

C. suchus.

Hier präsentieren wir die erste Auswertung von mitogenomischen Daten einer adulten ägyptischen Krokodilmumie aus einer

Zentrum der Krokodilverehrung und identifizieren dieses Exemplar als *C. suchus*. Unsere Daten legen nahe, dass *C. suchus* selektiv

für die Mumifizierung ausgewählt und unterstützen eine genaue ägyptische Kulturtaxonomie, wie sie von Herodot beschrieben wird

im vierten Jahrhundert v. Chr. und von Etienne Geoffroy Saint-Hilaire 1807 zur Beschreibung von *Crocodylus suchus* verwendet.

Crocodylus suchus hat eine Verringerung seines Verbreitungsgebiets erfahren, möglicherweise aufgrund des Klimawandels und der Austrocknung der Sahara in der jüngeren Vergangenheit. Unsere Daten, die eine erwachsene Krokodilmumie als *C. suchus* identifizieren, könnten auf die historische natürliche Vorkommen dieser Art im ägyptischen Nil zusammen mit *C. niloticus*. Zusätzliche Proben von Krokodile sowohl aus bioarchäologischen als auch aus paläontologischen Kontexten werden benötigt, um dies zu bestätigen.

1. Einleitung

Der französische Naturforscher Etienne Geoffroy Saint-Hilaire machte einen Versuch Beweise für die Variation zwischen ägyptischen Tierarten zu sammeln und zu dokumentieren Mumien und ihre modernen Verwandten mit der Absicht zu beweisen, dass Arten als Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen verändert (Le Guyader, 2004; Curtis et al., 2018). Während der Napoleonischen Expedition nach Ägypten (1798-1801), stellte er eine vielfältige Sammlung von Tier Mumien einschließlich Katzen (Richardin et al., 2017), Ibisse (Wasef et al., 2015), Spitzmäuse (Woodman et al., 2017) und Krokodile (Geoffroy Saint-Hilaire, 1807). Geoffroy Saint-Hilaire war besonders interessiert an Vergleich anatomischer Merkmale und morphologischer Variationen zwischen alten und modernen Vertretern dieser Arten zu zeigen, dass Merkmale waren über die Zeit hinweg veränderbar. In den letzten zwei Jahrzehnten haben Forscher Analyse der Überreste von Tieren aus archäologischen Stätten haben die große Fortschritte bei der Gewinnung genomischer Daten, um besser zu verstehen, wie die Die Verteilung der Variation bei wilden und heimischen Arten steht im Zusammenhang mit die menschliche Nutzung und Manipulation der natürlichen Ressourcen (Vilstrup et al., 2013). Zweihundert Jahre nach den Hypothesen von Geoffroy Saint-Hilaire, Moderne Sequenziertechnologien haben es den Forschern ermöglicht, zu zeigen dass uralte DNA in den Überresten von Tiermumien vorhanden ist und kann direkt mit Daten von modernen Taxa verglichen werden (Curtis et al, <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102483>)

Eingegangen am 17. Januar 2019; In überarbeiteter Form eingegangen am 10. Juli 2020; Akzeptiert am 14. Juli 2020

* Korrespondierender Autor bei: Fordham University, Department of Biological Sciences, Bronx, NY 10458, USA.

E-Mail-Adressen: EHeikkala@Fordham.edu (E.R. Heikkala), aardemam@mail.montclair.edu (M.L. Aardema), anarechania@amnh.org (A. Narechania), GAmato@amnh.org (G. Amato), Salimalkram@gmail.com (S. Ikram), MShirley@FIU.edu (M.H. Shirley), KVliet@UFL.edu (K.A. Vliet), sethwcunningham@gmail.com (S.W. Cunningham), TGilbert@Bio.KU.DK (M.T.P. Gilbert), O.Smith@micropathology.com (O. Smith).

[Journal of Archaeological Science: Berichte 33 \(2020\) 102483](https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102483)

Online verfügbar ab 16. September 2020

2352-409X/ © 2020 Der/die Autor(en). Veröffentlicht von Elsevier Ltd. Dies ist ein Open-Access-Artikel unter der CC BY-NC-ND-Lizenz

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

T

2018; Hekkala et al., 2011; Kurushima et al., 2012).

In einem solchen Beispiel verwendeten die Forscher die Sanger-Sequenzierung von nuklearen und mitochondrialen Genregionen zu zeigen, dass das bekannte Nilkrokodil die in ganz Afrika vorkommt, besteht eigentlich aus zwei Arten. Die eine, die bekannte Das Nilkrokodil (*Crocodylus niloticus*) ist in ganz Ost- und südlichen Afrika, und eine zweite, kryptische Art, die jetzt in West- und Zentralafrika gefunden (Hekkala et al., 2011). In dieser Studie, kurze mitochondriale DNA-Sequenzen, die aus einer Reihe von mumifizierten geschlüpfte Krokodile aus Theben und der Grotte De Samoun (heute als Ma'abdeh) in Ägypten wurden gefunden, die mit denen von existierenden Krokodil Populationen in West- und Zentralafrika. Die Autoren identifizierten eine zuvor vorgeschlagener Artname, *Crocodylus suchus*, aus der Literatur (Geoffroy Saint-Hilaire, 1807). Die Originalbeschreibung dieser Art basiert auf einer juvenilen Krokodil-Mumie, die in Theben gesammelt wurde während Napoleons Expedition nach Ägypten und abgebildet auf Tafel 55 der Folio-Version der "Description de L'Egypt" (Geoffroy Saint-Hilaire, 1807; Jomard und Jacotin, 1818; Hekkala et al., 2011).

Heute existiert die wiederauferstandene Art, *Crocodylus suchus*, in Populationen im gesamten westlichen Afrika, einschließlich des Kongobeckens, extreme nordwestlichen Uganda (Shirley et al., 2015, Cunningham et al., 2016), dem Awash-Flussbecken in Äthiopien (Siege und Koch 2017), und in einem isolierten Guelta in der Ennedi-Hochebene des Tschad (Schmitz et al., 2003). Genetische Barcoding-Nachweise aus weiteren historischen Museumssammlungen, bestätigte jedoch, dass sich die Verbreitung dieser Art auf Melut im Weißen Nil bis 1922 (Abb. 2, und Abb. 1a und b in Hekkala et al., 2011). Umfangreiche Erhebungen im letzten Jahrzehnt haben keine diese Art unter den existierenden Krokodilpopulationen in Ägypten anzutreffen (Shirley et al., 2012, 2015).

Geoffroy Saint-Hilaire stellte in seiner Arbeit von 1807 die Hypothese auf, dass die Arten wären wahrscheinlich sowohl im Niltal als auch im westwärts durch die Sahara während eines Zeitraums, in dem nördliche Afrika war feuchter (Geoffroy Saint-Hilaire, 1807). Nach Geoffroy Saint-Hilaire und aufgrund der bestätigten Anwesenheit des Schlüpfings *C. suchus*-Mumien aus Theben und der Ma'abdeh-Grotte in Ägypten, schlagen wir vor dass 1) die altägyptische Volkstaxonomie die Existenz von zwei differenzierten Formen von African *Crocodylus*, und 2) die Die Verbreitung der heiligen Arten war in der Sahara größer und das Nilbecken in den vergangenen Jahrtausenden.

Um die taxonomische Identität des Krokodils weiter zu bewerten

Mumien und helfen auch dabei, die historischen Verbreitungen von *C. suchus* und *C. niloticus* im alten Ägypten, verwenden wir Next-Generation-Sequenzierung von angereicherte DNA-Bibliotheken, um mitogenomische Daten von einem erwachsenen Krokodil-Mumie (ca. 3. Jh. v. Chr. - 2. Jh. n. Chr.), die als aus der Tempel von Kom Ombo (Ägypten), ein Ort der Verehrung für das Krokodil köpfigen Gott Sobek (Ikram, 2015).

2. Materialien

2.1. Proben der Krokodil-Mumie

Wir haben eine Krokodilmumie beprobt, die sich derzeit im Natural Historisches Museum des Salzkammergutes, Österreich (NMSG-A) für Knochen und Muskelgewebe für die Sequenzierung. Basierend sowohl auf der Größe der Mumie und Archivadokumente, die vom Museumskurator zur Verfügung gestellt wurden, dieses Exemplar stammt wahrscheinlich aus der Stätte von Kom Ombo in Ägypten, wo sich ein Ptolemäischer Tempel und ein nahe gelegener Tierfriedhof in al-Shutb, bekannt für seine großformatigen mumifizierten Krokodile. Der Tempel ist gewidmet dem Der krokodilköpfige Gott Sobek, eine wichtige ägyptische Gottheit, die geglaubt wurde um Fruchtbarkeit und Stärke zu verleihen. Das Exemplar, ein Geschenk der ägyptischen Regierung an Professor Otto Stober in den Jahren 1960-61, wurde in der Moormuseum in Bad Neyhardting bis zur Auflösung des Museums in 2000. Danach wurde es in die NMSG-A überführt, wo es derzeit ausgestellt ist (Abb. 1). Über die Herkunft des Exemplars ist sonst wenig bekannt, jedoch Merkmale des Mumifizierungstyps und der Umhüllung mit denen anderer in-situ Kom Ombo Krokodil-Mumien übereinstimmen, ein Bereich die die Hauptquelle für Museumsexemplare dieser Größe ist (z. B., British Museum EA 38562; Ägyptisches Museum Kairo CG 29.628 und CG 29630).

Wie für Krokodilmumien typisch, war die Mumie ausgetrocknet, gesalbt mit Ölen und harzigen Stoffen und in Leinenbinden gewickelt von harzhaltigen Materialien durchdrungen (Ikram und Iskander, 2002).

Basierend auf der Gesamtlänge des Exemplars (2,5 m) und dem Nachweis einer umgedrehten mumifizierten Penis repräsentiert die Krokodilmumie wahrscheinlich einen reproduktiven reifes Männchen.

2.2. Vouchered zeitgenössische und Krokodil-Museumsproben.

Wir haben beglaubigte Proben von lebenden Tieren (zeitgenössisch) einbezogen und aus naturkundlichen Sammlungen (Archiv), um eine vergleichende mitogenomischer Datensatz zur phylogenetischen Einordnung der alten (aDNA) Mumiensequenzen (siehe Tabelle 1 für Details zu den Proben). Um die Rekonstruktion zu erleichtern

der phylogenetischen Beziehungen des Mumien-Mitogenoms haben wir alle Mitglieder der Gattung *Crocodylus* einbezogen und hinzugefügt *Osteolaemus tetraspis*-Daten aus der Genbank als Outgroup. Museumsexemplare werden im Folgenden zur Unterscheidung als "Archivproben" bezeichnet zwischen diesen und den "alten" Mumienproben.

3. Labor-Methoden

3.1. Extraktion genomischer DNA und Vorbereitung der Bibliothek

3.1.1. Mumienproben

Die Proben der Krokodilmumie wurden vor Ort am NMSG-A in Bad Ebensee, Österreich während der Ausstellungsrenovierung. Mit sterilisierte Großlochbohrer und Folienreservoir, eine getrocknete Gewebeprobe (Probe KomOmbo21, Replikat 1) und eine Knochenprobe (Probe KomOmbo22, Replikat 2) wurden jeweils aus der Skapularregion entnommen, die zunächst mit verdünnter Bleiche (0,5 %) abgewischt und an der Luft getrocknet wurde. An mögliche DNA-Schäden durch Erhitzung oder Vibration zu reduzieren, wurde der Bohrer auf die langsamste Einstellung eingestellt. Die erste Probe wurde aus getrocknetem Muskel entnommen und der Bohrer wurde durch einen neuen sterilen Bohrer ersetzt und eine Probe von der freiliegende Knochen wurde an der gleichen Stelle nach einer zusätzlichen Oberflächensterilisation. Für jedes Replikat wird eine ca. 30-40 mg Gewebeprobe (KomOmbo 21) oder Knochenprobe (KomOmbo 22) wurde entnommen in einem sterilen Folienreservoir. Für Scheinprobenkontrollen für jede Replikat wurde ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen neben die Arbeitsbereich und mit sterilen Entnahmematerialien für jede Probe berührt gesammelt. Nach der zerstörenden Probenahme wurde der Prüfling für Anzeige. Die Proben (KomOmbo21 und 22 bzw. Blank 21 und 22) wurden dann zu einer Reinraumlabor Einrichtung transportiert und dort verarbeitet an der Universität von Kopenhagen.

Vor der Extraktion wurden die Oberflächen von Gewebe- und Knochenproben

Abb. 1. Die Krokodilmumie (nur der Kopf), die in-situ im Naturkundemuseum ausgestellt ist Historisches Museum-G, Salzkammergut-Österreich (Inset in voller Länge).

E.R. Hekkala, et al. Journal of Archaeological Science: Berichte 33 (2020) 102483

2

Abb. 2. Karte des Einzugsgebiets des Nils und historische und aktuelle Verbreitungsgebiete von *Crocodylus niloticus* und *C. suchus* und große Krokodilmumie Standorte, die im Text besprochen werden. Aktuelle Verteilungen von *C. niloticus* (hellblau) und *C. suchus* (hellbraun) modifiziert aus [Shirley et al. \(2015\)](#). Archivierte Exemplare von *C. niloticus* (blau) und *C. suchus* (braun) sind aus [Hekkala et al. \(2011\)](#). Extant *C. suchus* Probe Standorte ([Shirley et al., 2015](#); [Cunningham et al., 2016](#)) sind in Gold dargestellt. Madagaskar ist in der einfügen.

Tabelle 1

Zeitgenössische und archivierte Krokodil-Proben sequenziert zum Vergleich mit dem Mitogenom der Salzkammergut-Mumie. Für zeitgenössische Proben Akronym (AMCC) ist die Ambrose Monel Cryo Collection im American Museum of Natural History, (EH) ist E. Hekkala, (MHS) M.H. Shirley, (AZA) ist Association of Zoos and

Aquarien und (SAAF) ist der St. Augustine Alligator Farm Zoological Park, St. Augustine Florida. Für Archivproben aus Museumssammlungen ist das Akronym (AMNH) das American Museum of Natural History, Abteilung für Herpetologie und (NMSG-A) ist das Naturhistorische Museum des Salzkammergutes, Österreich.

Organismus Probenname DNA-Zustand Quelle Akzession Lokalität

Crocodylus acutus AMNH7120 Museumsarchiv AMNH MT727010 Keine Daten
Crocodylus acutus NC_015647.1 modern Genbank NC_015647.1 NA
Crocodylus intermedius L193 modern SAAF MT727027 Venezuela
Crocodylus johnsoni L122 modern SAAF MT727018 In Gefangenschaft gezüchtet
Crocodylus johnsoni L072 modern SAAF MT727019 In Gefangenschaft gezüchtet
Crocodylus johnsoni NC_015238.2 modern Genbank NC_015238.2 NA
Crocodylus mindorensis L119 modern SAAF MT727007 Philippinen (Gefangenschaftsnachzucht)
Crocodylus mindorensis L080 modern SAAF MT727017 Philippinen (Gefangenschaftsnachzucht)
Crocodylus moreletii NC_015235.1 modern Genbank NC_015235.1 NA
Crocodylus niloticus amnh142496 Museumsarchiv AMNH MT727003 Madagaskar
Crocodylus niloticus amnh7130 museum archival AMNH MT727004 Keine Daten
Crocodylus niloticus amnh73047 museum archival AMNH MT727005 Kenia
Crocodylus niloticus AMNH71192 Museumsarchiv AMNH MT727006 Madagaskar
Crocodylus niloticus AMNH29291 Museumsarchiv AMNH MT727009 Keine Daten
Crocodylus niloticus mad352 modern EH MT727013 Madagaskar (LacBemaba)
Crocodylus niloticus Ank1 modern EH MT727014 Madagaskar (Ankarana)
Crocodylus niloticus Ank14 modern EH MT727016 Madagaskar (Ankarana)
Crocodylus niloticus Tana3 modern EH MT727021 Kenia (Tana River)
Crocodylus niloticus NEDE02 modern MHS MT727022 Ägypten (Nassersee)
Crocodylus niloticus NEDE03 modern MHS MT727028 Ägypten (Nassersee)
Crocodylus novaeguineae L184 modern SAAF MT727020 Papua-Neuguinea (Fly River-Captive Bred)
Crocodylus novaeguineae L088 modern SAAF MT727023 Papua-Neuguinea (Fly River-Captive Bred)
Crocodylus palustris AMCC110220 modern AMCC MT727012 Keine Daten
Crocodylus palustris NC_014706.1 modern Genbank NC_014706.1 NA
Crocodylus porosus NC_008143.1 modern Genbank NC_008143.1 NA
Crocodylus rhombifer L138 modern SAAF MT727024 In Gefangenschaft gezüchtet
Crocodylus rhombifer L139 modern SAAF MT727025 In Gefangenschaft gezüchtet
Crocodylus rhombifer L140 modern SAAF MT727026 In Gefangenschaft gezüchtet
Crocodylus siamensis LZ013 modern AZA MT727015 In Gefangenschaft gezüchtet
Crocodylus suchus AMNH127255 Museumsarchiv AMNH MT727008 Keine Daten
Crocodylus suchus AMNH118718 Museumsarchiv AMNH MT727011 Keine Daten
Crocodylus suchus NKRP03 modern MHS MT727029 Gambia
Crocodylus suchus NKRP04 modern MHS MT727030 Gambia
Crocodylus suchus NKabak04 modern MHS MT727031 Guinea
Crocodylus suchus KomOmbo_Mummy21 Altes NMSG-A MT727032 Ägypten (Wahrscheinlich Kom Ombo)
Crocodylus suchus KomOmbo_Mummy22 Antike NMSG-A MT727033 Ägypten (Wahrscheinlich Kom Ombo)
Osteolaemus tetraspis tetraspis NC_009728.1 modern Genbank NC_009728.1 Kamerun
E.R. Hekkala, et al. Journal of Archaeological Science: Berichte 33 (2020) 102483

3

fünf Sekunden lang in einer 5 %igen Bleichlösung gespült und dann drei mal in ultrareinem Wasser und getrocknet. Jede Probe (ob Knochen oder Gewebe) wurde zusammen mit Leerwertkontrollen in jedem Schritt verarbeitet, so dass insgesamt

von vier Proben. Das alte DNA-Extraktionsprotokoll für Knochen (KomOmbo22) folgte weitgehend Dabney ([Dabney et al., 2013](#)) mit geringfügige Änderungen. Etwa 300 mg pulverisierter Knochen wurden Aufschluss über Nacht bei 37 °C in 1 ml Extraktionspuffer (0,45M EDTA, 0,25 mg ml Proteinase K, pH 8,0) unter Schütteln. Die Gewebeprobe (KomOmbo21) wurde ohne einen initialen EDTA-Weichenschritt verdaut. Ungefähr 300 mg getrocknetes Gewebe wurde zerkleinert und über Nacht aufgeschlossen bei 37 °C in 1 ml Extraktionspuffer (0,45M EDTA, 0,25 mg ml Proteinase K, pH 8,0) unter Schütteln. Der Rückstand für jede Probe wurde dann durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (16.000 g) pelletiert und der Überstand wurde in 15 ml Volumen Bindepuffer in Zymo large Format Spin Column Reservoirs, die an Qiagen MinElute Spin Columns angebracht sind. Nach einer Ruhezeit von 15 min wurden die modifizierten großformatigen Säulen in 50-ml-Falcon-Röhrchen eingelegt und bei niedriger Geschwindigkeit (600 g) zentrifugiert für 20-30 min. Die an die MinElute-Säulen gebundene DNA wurde zweimal gewaschen mit 500 µL PE-Puffer und eluiert durch Zugabe von 20 µL Elutionspuffer in zwei Runden der Zentrifugation für ein Gesamtvolumen von 40 µL. Leerwerte für jede Replikate folgte dem Extraktionsprotokoll für die entsprechende Probe. Die Wiederfindung der DNA wurde mit dem Qubit dsDNA HS Assay-Kit und doppelsträngige DNA-Bibliotheken wurden aus den DNA-Extrakten hergestellt unter Verwendung des BEST-Protokolls (Blunt-End Single Tube) ([Carøe et al., 2017](#)). Wir Anschließend wurde mittels quantitativer PCR die Anzahl der erforderlichen Zyklen bestimmt um ein optimales Amplifikationsplateau für die anschließende Indizierungs-PCR zu erreichen. Nach der Doppelindex-PCR haben wir die erfolgreiche Amplifikation der Bibliothek überprüft unter Verwendung eines Agilent Bioanalyzer-Geräts. Bei Kontroll-Leerwerten wird ein Bioanalyzer-Ergebnisse, die eine "Flatline" zwischen Größenstandards darstellen, wurden als eine saubere Probe betrachtet.

3.1.2. Auszüge für belegte zeitgenössische & archivierte Museen Krokodil-Exemplare.

Alle zeitgenössischen Proben wurden in Form von Aliquoten von gefrorenes Vollblut (St. Augustine Alligator Farm Zoological Park-SAAF, AMCC) oder als getrocknete Blutflecken auf Whatman-Filterpapier (SAAF, MS und ERH). Wir extrahierten genomische DNAs mit dem Qiagen DNA Blut- und Gewebe-Kit-Protokolle für nukleiertes rotes Blut nach Methoden, die der Lieferant zur Verfügung stellt.

Für die archivierten Gewebeproben aus historischen Museumsexemplaren, alle Probenmanipulationen fanden in den speziellen sauberen DNA-Einrichtungen statt am AMNH wie in [Hekkala et al. \(2011\)](#) beschrieben. Kleine Stücke von Gewebe die an Schädeln oder postkranialen Material haften, wurden aus getrockneten Proben mit sterilen Werkzeugen und zur Rehydrierung für 12 h in PBS eingeweicht. Zwischen 30 und 90 mg des rehydrierten Gewebes wurden dann über Nacht verdaut bei Raumtemperatur mit Qiagen-Puffer ATL und Proteinase K und leichtes Schütteln. Alle weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers

Protokoll mit der Ausnahme, dass die abschließende Elution die Erhitzen des EB-Puffers auf 56°C und Ruhenlassen des Puffers auf der Säule Membran für 15 min vor der Zentrifugation. Jede Probe wurde eluiert zweimal in 80 µL (2 × 40 µL) Puffer EB.

Genomische DNAs wurden an Arbor Biosciences (Ann Arbor, MI, USA) in separaten Sendungen zur Bibliotheksvorbereitung, wenn die Proben Extrakte wurden getrennt gelagert und behandelt. Die Proben wurden vorbereitet als Illumina Truseq-Bibliotheken vor der Anreicherung mit entweder Krokodil DNA-abgeleitete RNA-Köder (wie in Enk 2014), oder synthetische Mitobaits abgeleitet aus genomischen Ressourcen (siehe 3.2 unten). Bibliotheken wurden erstellt mit Je 25 µL zeitgenössischer oder archivierter DNA-Extrakt in Illumina®-Bibliothek Vorbereitungen und Indexierung mit eindeutiger P5- und P7-Indizierung Primer (Meyer und Kircher, 2010) in 40 µL Reaktionen unter Verwendung von 10 µL jeder Bibliothek gemäß den Standardprotokollen. Amplifikationen wurden in Echtzeit mit einer CFX96 Real-time PCR-Plattform durchgeführt (BioRad). Indizierte Bibliotheken wurden mit MinElute auf 15 µL TEB aufgereinigt.

3.2. Genomische Anreicherung

3.2.1. Entwicklung von RNA-Ködern, die von moderner Krokodil-DNA abgeleitet sind

Jeweils ca. 20 µL der DNA-Extrakte für sechs Krokodil-Taxa [*Crocodylus moreletii* (*n* = 1), *C. acutus* (*n* = 1), *C. siamensis* (*n* = 1), *C. suchus* (*n* = 2), *C. niloticus* (*n* = 2) und *Osteolaemus tetraspis* (*n* = 3)]

aus dem AMCC am AMNH wurden an Arbor Biosciences zur globalen Reverse Transkription (beide Stränge) mit biotinyliertem rUTP unter Verwendung ihrer proprietären Verfahren (Enk et al., 2014). Dies lieferte eine wässrige Suspension von etwa 100 µg gemischten Krokodil-RNA-Ködern, die sowohl intragenerische als auch Outgroup-Taxa.

3.2.2. Anreicherung von Mumienproben

Genomische Anreicherung für die beiden replizierten Kom Ombo-Mumien Proben fanden an der Universität Kopenhagen statt. Bibliotheken für jede Mumienproben-Replikat (KomOmbo21 = Replikat 1 und KomOmbo22 = Replikat 2) und Kontrollblanks wurden separat angereichert unter Verwendung des gesamten Genoms (WGE) von Krokodilen abgeleiteten Ködersatzes wie in Enk et al. (2014) beschrieben, und eine gezielte mitochondriale DNA (mitobaits) Köder-Set (Arbor Biosciences 2017). Für jede Anreicherung, Hybridisierungen wurden bei 48 °C für 48 h durchgeführt. Nach der Beadreinigung und MinElute Aufreinigung auf 15 µL TEB, angereicherte Eluate wurden für 9 Zyklen und anschließend mit MinElute auf 13 µL TEB aufgereinigt. Jede Erfassung Reaktion wurden 1 µg Köder und 9 µL indizierte Bibliothek verwendet, die sich im Bereich von 0,2 bis 5,8 ng/µL, geschätzt mit der Gesamtbibliotheksquantifizierung auf einem Hi-Empfindlichkeit Bioanalyzer-Chip. Ganzes Genom angereichert und Mito angereichert Bibliotheken für jede Probe (KomOmbo21 oder KomOmbo22) und Leerwertbibliotheken wurden jeweils gepoolt (50:50) und mit acht Multiplexern andere nicht verwandte alte Proben für die Sequenzierung auf einem Illumina HiSeq

4000-Gerät an der dänischen Nationalen Hochdurchsatz-Sequenzieranlage
Zentrum an der Universität von Kopenhagen.

3.2.3. Anreicherung für *beleghaftes zeitgenössisches und archiviertes Museum*

Exemplare

Bei Arbor Biosciences werden alle zeitgenössischen und archivierten Museumsexemplare
Die DNAs wurden separat mit dem eigenen MYbaits-Kit angereichert
Protokoll. Jede Capture-Reaktion verwendete 1 µg entweder Krokodil-RNA
Köder oder Mitobaits und 9 µL indizierte Bibliothek, die von 0,5 bis
5,3 ng/µL gemäß Schätzung mit Gesamtbibliotheksquantifizierung auf einem Hi-
Empfindlichkeit Bioanalyzer-Chip. Die Hybridisierungen erfolgten bei 48 °C für
48 h. Nach Bead Cleanup und MinElute Aufreinigung auf 15 µL TEB,
angereicherte Eluate wurden für 10 Zyklen amplifiziert und anschließend mit
MinElute auf 13 µL TEB. Dann 9 µL dieser wiederamplifizierten angereicherten Eluate
wurden in einer weiteren Runde der Erfassung unter identischen Bedingungen wie bei der
ersten Runde, außer der Inkubation bei 55 °C für 39 h. Diese wurden gereinigt und
dann mit MinElute auf 13 µL TEB gereinigt, die wir dann wieder amplifiziert haben
für 5 Zyklen. Diese endgültigen re-amplifizierten, doppelt angereicherten Bibliotheken wurden
dann auf 13 µL TEB aufgereinigt. Ganzes Genom angereichert (WGE) und gezielt
Capture-angereicherte (Mito) Bibliotheken wurden in Pools in einem 75/
25-Verhältnis und Paired-End-Sequenzierung auf einer Lane eines Illumina HiSeq®
2500 Durchflusszelle im New York Genome Center.

4. Analytische Methoden

4.1. Mumien-Daten

Die Adapter wurden zunächst mit cutadapt v1.13 entfernt ([Martin, 2011](#)) und die Reads wurden an mitochondrialen Referenzsequenzen von
Crocodylus niloticus (GB JF502243.1) und *Crocodylus suchus* (GB
JF502244.1, eine Akzession, die ursprünglich als *C. niloticus* in Genbank gelistet war, aber
derzeit als *C. suchus* erkannt) unter Verwendung von bowtie2 ([Langmead und Salzberg, 2012](#)) und dann de-dupliziert und gefiltert für minimale
Kartierungsqualität $q = 30$ mit SAMtools v1.4 ([Li et al., 2009](#)) ([Tabelle 2](#)).
Nach dem Mapping identifizierten wir die wahrscheinlichsten Ursprungsreferenzsequenzen
entsprechend der Sequenzabdeckung und der durchschnittlichen Abdeckungstiefe.
Wir haben dann Konsensus-Sequenzen aus diesen gemappten Reads des mt
E.R. Hekkala, et al. Journal of Archaeological Science: Berichte 33 (2020) 102483
4

Genom, das in der NCBI-Nukleotid (nt)-Datenbank für beide *C.*
niloticus und *C. suchus*. Schließlich führten wir ein BLAST-Alignment auf beide Konsensus
Sequenzen gegen die gesamte nt-Datenbank, um unsere Identifikation zu bestätigen.
Um die Kontamination während der Zubereitung zu beurteilen, analysierten wir alle
Leerstellen nach der gleichen Pipeline und eine Teilmenge der Roh-Reads wurden
auf Alignment mit der NCBI nt-Datenbank überprüft. Zur weiteren Beurteilung der Authentizität
unserer zugeordneten mitochondrialen Reads haben wir das Programm

mapDamage 2.0 (Jonsson et al., 2013) zur Beurteilung von Mustern von aDNA-Strang Länge und C > U-Desaminierungsmuster (Abb. 3 und 4).

4.2. Daten von belegten zeitgenössischen und Krokodil-Museumsexemplaren

Nach der Sequenzierung wurden die Reads von jeder Probe mit das Python-Skript TQSFastq.py (<http://genomics.pubs.princeton.edu/prv/resources/scripts/TQSFastq.py>) mit einem Qualitätswert (q) von 20 und einem minimale Leselänge von 30. Wir haben dann die Reads für jede Probe gemappt zu unseren mitogenomischen Referenzsequenzen mit Hilfe des Programms BWA-MEM mit Standardeinstellungen (Li, 2013). Nach dem Mapping haben wir identifiziert und markierte Leseduplikate mit dem Tool MarkDuplicates aus Picard (v. 1,77; <http://broadinstitute.github.io/picard/>). Es folgte die Indel-Realignment mit IndelRealigner aus der Genomanalyse Toolkit (GATK v.3.8; McKenna et al., 2010). Als nächstes haben wir für jede Probe verwendete das Programm BCFtools (v. 1.9; Li, 2011), um divergente Stellen mit die Befehle 'mpileup' und 'call'. Mit 'mpileup' wird das maximal gelesene Tiefe wurde auf 1000 gesetzt. Für den 'call'-Befehl verwendeten wir den multialleliccaller mit Ploidie auf 1 (d. h. 'haploid') gesetzt. Für beide Befehle haben wir nicht variierende Standorte, gruppiert in Blöcken nach Mindesttiefe (Option '-g'). Wir haben dann einen Konsens der mitochondrialen Daten jeder Probe erstellt Genom, das divergierende Stellen enthält, während Stellen maskiert werden, die eine Lesetiefe kleiner als 10, eine Mapping-Qualität kleiner als 20 und/oder eine Basis Qualität weniger als 20. Maskierte Stellen wurden im Ergebnis durch 'N' ersetzt FASTA-Datei.

4.3. Phylogenetische Analyse.

Wir untersuchten das individuell rekonstruierte mitochondriale Genom Sequenzen aus den beiden replizierten Salzkammergut-Mumienproben (KomOmbo21 und KomOmbo22) in einem Datensatz mit weiteren Mitogenomen die aus den neu sequenzierten zeitgenössischen und Archivproben und veröffentlichte Krokodil-Mit Genome aus Genbank (Tabelle 1). Wir haben mt-Genomdaten für 12 existierende Arten einbezogen von *Crocodylus* und einer Outgroup (*Osteolaemus*). Für *C. niloticus*, *C. suchus*, und anderen weit verbreiteten Mitgliedern der Gattung *Crocodylus* haben wir mehrere individuelle mt-Genome, um die intraspezifische Variation darzustellen. Wir richtete die mitochondrialen Genome in diesem Datensatz mit Clustal Omega (v. 2.1, Larkin et al., 2007). Nach dem Alignment trimmten wir beide Enden der Sequenz an die Sequenzlänge unseres Salzkammergutes anpassen Mumienproben.

Mit diesem ausgerichteten und beschnittenen Datensatz haben wir die beste Partitionierungsschema und Nukleotid-Substitutionsmodell für diese Daten mit PartitionFinder 2.1.1 (Lanfear et al., 2016) unter Berücksichtigung von Modellen implementierbar in RAxML (Stamatakis, 2014) und mit kleiner Stichprobengröße korrigierte Version des Akaike-Informationskriteriums (AICc) (Ergänzende Tabelle 1). Die erste, zweite und dritte Position für die

mitochondriale kodierende Sequenzen wurden separat untersucht. Unter Verwendung der beste Partitionierungsschema zu finden, führten wir sowohl eine Maximum-Likelihood (ML) und Bayes'sche Inferenz (BI) phylogenetische Analysen (Darriba et al., 2012; Guindon und Gascuel, 2003). Wir führten unsere ML phylogenetische Analyse mit RAxML 8.2.12 (Stamatakis, 2014). Maße der Knotenpunkte Unterstützung für ML-Analysen wurden aus 1000 nicht-parametrischen Bootstrap-Wiederholungen und jeder Lauf begann mit einem zufälligen Startbaum. MrBayes 3.2.6 (Ronquist und Huelsenbeck, 2003; Altekar et al., 2004) wurde verwendet, um phylogenetische Beziehungen mithilfe von BI zu rekonstruieren. Ein Markov Ketten-Monte-Carlo-Verfahren wurde für vier simultane Ketten mit zwei Millionen Generationen, jeweils ausgehend von einem zufälligen Baum und unter Verwendung der **Tabelle 2**

Next Generation Sequencing (NGS) Lesestatistiken für angereicherte Bibliotheken für jede Krokodilmumienprobe (KomOmbo21 oder KomOmbo22) und die Extraktionsleerwerte.

Probenname	Probenquelle	Roh-Reads	Deduplizierte Roh-Reads	Gemappt auf JF502243.1	Crocodylus niloticus					
Zugeordnet zu JF502244.1	Crocodylus suchus	Endogen %	Bedeckungstiefe	JF502243.1	Abdecktiefe					
JF502244.1	KomOmbo21 (Rep 1)	Skapularfläche	Gewebe	10,053,918	7,010,213	4585	4591	0.065404573	12.3	12.3
KomOmbo22 (Rep 2)	Skapulierknochen	152.460.620	92.713.171	10.373	10.385	0,01118827	28,9	29		
KomOmbo21 (Blank1)	NA	3101	2587	0	0	0	0	0		
KomOmbo22 (Blank2)	NA	5035	4953	0	0	0	0	0		

E.R. Hekkala, et al. Journal of Archaeological Science: Berichte 33 (2020) 102483
5

Standard-Heizschema. Markov-Ketten wurden alle 1000 Tage abgetastet Generationen, wobei die ersten 25 % der Bäume als Burn-In verworfen werden. Zwei Millionen Generationen waren ausreichend für die Standardabweichung von Split Frequenzen unter 0,01 zu senken.

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der Sequenzierung

Beide Replikate von alten Proben des Salzkammergut-Krokodils Mumie KomOmbo21 (Gewebe) und KomOmbo22 (Knochen) ergaben ausreichende Bibliotheken für die Sequenzierung. Nach dem Trimmen, Deduplizieren und Mapping, unsere Daten schlugen die wahrscheinlichsten Kandidaten Referenzen zu beide Replikate als das veröffentlichte mitochondriale Genom von *C. suchus* (JF502244.1), mit einer fast doppelt so hohen Abdeckung wie die nächstbeste Übereinstimmung

C. niloticus (JF502243.1) (Tabelle 2). Unter Verwendung des *C. suchus* Mitochondriums als Proxy, stellten wir fest, dass die normalisierte (d. h. nach Entfernung doppelter Liest aus den Primärdaten) endogener Gehalt der Probe 21 (Replik 1) auf 0,07 % und Probe 22 (Replik 2) auf 0,01 % (Tabelle 2). Obwohl der endogene DNA-Gehalt der Proben niedrig, unsere Abdeckung für die *C. suchus* Mitogenom-Daten war 99,9 % RefSeq Identität zur nächstgelegenen Referenz für beide Replikate, und zwischen 12,3x und 29,0x mittlere Bedeckungstiefe (Abb. 5). Aufgrund der geringeren Kopienzahl und generell niedrigen endogenen Gehalt, konnten wir keine nuklearen Genregionen in beliebiger Tiefe aus beliebigen Probenbibliotheken.

5.2. Reihenfolge der Authentizität und Kontamination

Die Fragmentgrößenverteilung der gemappten Reads war typisch für eine alte DNA-Zusammensetzung, die bei 42nt ihren Höhepunkt erreicht (Abb. 4). Cytosin-Desaminierung

Muster waren ebenfalls typisch für antike DNA und wiesen erhöhte C > U-Übergänge an den terminalen 5'-Enden von Sequenzierungs-Reads, und symmetrisch erhöhte G > A Übergänge und die 3' Enden (Abb. 3). Wir sind daher von der Authentizität dieser Daten überzeugt. Wir haben eine Teilmenge von Reads durch vollständiges Metagenomics-BLAST, um a) sekundäre Bewertung des endogenen Gehalts und b) Bewertung möglicher Verunreinigungen. Obwohl es sowohl mikrobielle als auch menschliche Inhalte in der rohen Lesedaten konnten wir zeigen, dass keine Kontamination die in einem der Rohlinge aus dem Extraktionsprozess vorhanden sind, indem Sie die Blank Reads zu zwei Referenzdatenbanken, die Mitogenome von Mensch und Krokodil. Eine einzelne deduplierte Sequenz (n = 32) des Leerstellen, die in den Reads enthalten sind, die der mitochondrialen Datenbank des Krokodils zugeordnet sind,

und null Reads auf das menschliche Mitochondrium abgebildet. Insgesamt 205 Reads aus den Salzkammergut-Mumienproben, die auf den menschlichen Mitochondriums; diese waren für die Authentifizierung über mapDamage, aber wenige genug, um sicher zu sein, dass keine Kontamination durch jede Quelle. Der hohe Anteil an vom Menschen stammenden Reads in der BLAST-Analyse, obwohl nicht unerwartet, könnte von alter menschlicher Kontamination stammen aus der Mumifizierungswerkstatt oder könnte auch als

Funktion der Datenbank-Überrepräsentation (Smith et al., 2015), eine vollständige deren Analyse den Rahmen dieser Studie sprengen würde.

BLAST-Analysen der COX1- und D-Loop-Regionen zeigten, dass in allen Fällen, die nächstgelegenen Datenbank-Treffer nach prozentualer Identität zu den Konsensus-Sequenzen abgeleitet von *C. suchus*. Das an *C. suchus* angeglichenes COX1-Gen im Besonderen zeigte eine deutlich mehr unterstützte Übereinstimmung mit der nächstgelegenen Übereinstimmung

(*C. niloticus*) bei 4 %, während die D-Schleifen-Sequenz identisch war mit unserer *C.*

suchus-Referenz-D-Schleife mit einem Abstand von 1% zur nächsten Übereinstimmung.

5.3. Phylogenetische Analyse

Wir untersuchten die Position von jedem der beiden rekonstruierten mitochondrialen Haplotypen aus der Salzkammergut-Mumie im Vergleich mit zuvor veröffentlichten vollständigen mitogenomischen Daten für fünf extant *Crocodylus* aus der GenBank und mit neu gefundenen Krokodilen Mitogenome für zehn weitere *Crocodylus*-Arten Vertreter aus modernen Proben und archivierten Museumsexemplaren, um besser

Abb. 3. MD: mapDamage-Desaminationsplot von Sequenzier-Reads, die auf das Mitochondrium von *Crocodylus suchus* gemappt wurden, und zeigt Deaminationsmuster, die typisch für alte DNA. Oberes Feld A, KomOmbo21, Replik 1; unteres Feld B, KomOmbo22, Replik 2.

E.R. Hekkala, et al. Journal of Archaeological Science: Berichte 33 (2020) 102483

6

historische und antike phylogeographische und phylogenetische Variation innerhalb von African *Crocodylus*. Für unsere phylogenetischen Analysen wurde die Das bestgeeignete Modell für jede Partition war das verallgemeinerte zeitumkehrbare Modell (Tavaré, 1986) mit einem Anteil an unveränderlichen Standorten und einem Gamma-Verteilung der Ratenheterogenität (d. h. GTR + I + Γ -Modell). Siehe SI Tabelle S1 für die vollständigen Details der Partitionen und Modelle. Sowohl unsere Maximum-Likelihood- als auch unsere Bayes'sche Inferenz-Analyse von Ausgerichtete Mitogenome, die aus den Daten der Krokodilmumie gewonnen wurden, ergaben in nahezu identischen Bäumen ohne Änderung der Platzierung der Mumiensequenzen (Abb. 6, ergänzende Abb. S1). Für beide baumbasierten Platzierungen, die Konsensbäume bestätigten, dass die Krokodil-Mumie aus dem Salzkammergut repräsentiert *C. suchus*. Unsere Ergebnisse zeigen auch, dass Haplotypen für zwei zeitgenössische *C. niloticus*-Proben aus modernen Ägypten bilden eine eigene Subklade innerhalb der Klade, die alle anderen zeitgenössischen und archivierten *C. niloticus*-Proben. In ähnlicher Weise fanden wir, dass fünf *C. niloticus*-Proben aus Madagaskar bilden eine gut unterstützte Subklade innerhalb von *C. niloticus*.

6. Diskussion

6.1. Antike DNA von einer Mumie

Die Untersuchung alter DNA, insbesondere von anthropogenen mumifizierten Proben, war mit Fragen der Authentizität behaftet

Abb. 4. FL: Fragmentlängenplot von Sequenzier-Reads, die auf das Mitochondrium von *Crocodylus suchus* gemappt wurden, mit typischen Fragmentlängenverteilungen für alte DNA.

Oberes Feld A, KomOmbo21, Replik 1; unteres Feld B, KomOmbo22, Replik 2.

Abb. 5. Coverage-Plot der Reads, die auf das Mitochondrium von *Crocodylus suchus* gemappt wurden, nach Entfernung von Duplikaten und Mapping-Filterung auf minimale mapQ = 30.

E.R. Hekkala, et al. Journal of Archaeological Science: Berichte 33 (2020) 102483

7

(Gilbert et al., 2005; Lorenzen und Willerslev, 2010). Wie bei allen aDNA

Analysen, müssen mehrere Authentifizierungsmethoden für Analysen von Sequenzen, die aus altägyptischen mumifizierten Überresten gewonnen wurden ([Drosou et al., 2018](#)). Kürzlich wurden Werkzeuge entwickelt, um effektiv zeitabhängige Schäden von natürlich auftretenden Mutationen zu unterscheiden im Genom und zur Identifizierung von Formen der mikrobiellen und modernen Kontamination ([Briggs et al., 2007](#)). Unsere Sequenzier-Replikat-Ergebnisse von Duplikatproben aus Gewebe und Knochen etablieren die Vorhandensein von authentischen mitogenomischen Daten von einem einzelnen Krokodil Mumie. Außerdem zeigen sie das Potenzial für die Sequenzierung angereicherter DNA-Bibliotheken zur Gewinnung nahezu vollständiger Mitogenome von Krokodilen Mumien aus dem Zeitraum ca. 3. Jh. v. Chr. - 2. Jh. n. Chr., der Blütezeit der Tiermumifizierung, und die Zeit, als die meisten Sobek-Tempel mit Mumien aktiv waren ([Bresciani, 2015](#)).

6.2. Taxonomische Identität und phylogeographische Muster

In seiner 1807 erschienenen Beschreibung des heiligen Krokodils, *C. suchus*, *beschreibt* Geoffroy Saint-Hilaire bezog sich ausgiebig auf frühere anekdotische Beweise von Herodots Histories, Elemente davon erscheinen auch in Strabos 1. Jahrhundert v. Chr. Bericht über Ägypten (Buch XVII: 38, 39, 47). Nach Herodot, im alten Ägypten wurde eine Art von heiligem Krokodil gepflegt in Tempeln und mit goldenen Ohrringen und Armbändern geschmückt. Diese heiligen Krokodile wurden mit Kuchen und Wein, vermischt mit Honig, gefüttert und mumifiziert, und in Tempeln aufgestellt (Herodot II: 69). Die ägyptischen Stätten, an denen Krokodil-Gottheiten waren am häufigsten im Fayum im Norden, und Theben und Kom Ombo im Süden, mit ein paar anderen Stätten, wie Ma'abdeh, dazwischen.

Unsere phylogenetischen Analysen von unabhängig replizierten Mitogenomen aus zwei Gewebearten von der Krokodilmumie aus dem Salzkammergut bestätigen dieses adulte männliche Exemplar als *C. suchus*, "der heiliges Krokodil". [Geoffroy Saint-Hilaire \(1807\)](#) zitierte beide Verhaltensweisen und kulturelle Interpretationen dessen, was die Ägypter als Krokodil betrachteten "Taxa" und kombinierte diese mit seiner eigenen morphologischen Beurteilung von Artunterschieden in seiner Beschreibung von *C. suchus*.

Die Mumifizierung dieses erwachsenen Mannes im Stil des Tempels Krokodil-Mumien von Kom Ombo, legt nahe, dass die Wahl dieses bestimmte Spezies, anstatt *C. niloticus*, war ein Hinweis auf eine spezifische kulturelle Rolle für ihn in der Verehrung des Krokodilgottes Sobek. Ägypter könnte *C. suchus* gegenüber *C. niloticus* für diese Rolle bevorzugt haben, da ersterer sind typischerweise kleiner und weniger aggressiv gegenüber Menschen ([Brito et al., 2011](#)). Ähnliche Beschreibungen von "zahmen" Krokodilen, die auf dem Ennedi Plateau in Chad (Klemens, pers. Mitt.) entpuppte sich ebenfalls als *C. suchus* ([Schmitz et al., 2003](#)). Auch heute noch ist in ganz Westafrika der traditionelle Glaube an Gambia ([Moiser und Barber, 1994](#)), Benin ([Kpera, 2003](#)), Burkina Faso

(Toonen, 2003), und Mauretania (Brito et al., 2011, Velo-Antón et al., 2014), unter anderem, halten, dass diese heiligen Krokodile nicht angreifen werden Schwimmer und wird diejenigen schützen, die sie verehren.

Das Fortbestehen von isolierten Populationen, die als *C. suchus* in der Sahara von Mauretania und dem zentralen Tschad, sowie umfangreiche piktographische Nachweise für Krokodile in der gesamten Sahara (A. Zboray, 2017 pers. Mitt.; de Smet, 1998), und frühere Untersuchungen, die *C. suchus*' Anwesenheit zusammen mit *C. niloticus* im Weißen Nil des Sudan bis zu 1922 (Hekkala et al., 2011), deuten alle auf eine vorherige zusammenhängende Verteilung hin dieser Art im gesamten Sahara-Afrika. Das Potenzial für eine alte nordafrikanische Verbreitung von *C. suchus* mit einer relativ jungen Kontraktion wird auch durch Projektionen der Verteilung der feuchteren Lebensräume während des mittleren Holozäns (Egerer et al., 2018; Nicolas et al., 2018). Regelmäßige Konnektivität zwischen dem Nil und dem antiken See MegaChad, und in das westliche Nil-Flusseinzugsgebiet erleichterte wahrscheinlich die Verbreitung vieler Arten in der Sahara, einschließlich des Menschen (Drake et al., 2011), Varaniden (Dowell und Hekkala, 2016; Dowell et al., 2016), und Bufoniden (Nicolas et al., 2018). Paläoklimatische Aufzeichnungen während des mittelholozäne afrikanische Feuchtperiode (6-8000 ybp) (Brito et al., 2014; Egerer et al., 2018) und ökologische Nischenmodellierung (Cunningham 2015) unterstützen ein historisch günstigeres Klima für eine kontinuierliche Verteilung dieser Taxa als heute gefunden wird. Dieser Nachweis und Daten aus jüngsten Untersuchungen und genetische Analysen deuten stark darauf hin, dass die aktuelle Verteilung von *C. suchus* ist im Vergleich zu seiner früheren Verteilung stark reduziert quer durch die Sahara und innerhalb des Nilabflusses (Abb. 2).

Abb. 6. Maximum-Likelihood-Cladogramm, das die Platzierung von unterteilten mitochondriale Genome, die aus zwei replizierte Proben (KomOmbo21 und KomOmbo22) für die Krokodil-Mumie aus dem Naturhistorischen Museum-G, Salzkammergut-Österreich relativ zum Bestand Mitglieder der Crocodylidae. Zweigwerte sind Maximum-Likelihood-Bootstrap-Unterstützung. Die Platzierung bestätigt die Mumie als *Crocodylus suchus*.

E.R. Hekkala, et al. *Journal of Archaeological Science: Berichte* 33 (2020) 102483

8

Rückschlüsse auf die Verteilung von Arten anhand von Proben aus archäologischen Kontexte sind von Natur aus begrenzt, da Menschen eine lange Geschichte des Umzugs von Tieren sowohl für kulturelle als auch landwirtschaftliche Zwecke. Frühere Daten von Mumien des schlüpfenden *C. suchus* in Theben

([Hekkala et al., 2011](#)) ist zweideutig in Bezug auf das Vorhandensein von wilden *C. suchus* im ägyptischen Nil. Es ist möglich, dass Krokodile, oder sogar unausgebrütete Eier, wurden von anderen Orten mitgebracht oder wurden über Zucht in Gefangenschaft in lokalen Tempeln ([Molcho, 2014](#)). Lokale Beschaffung von erwachsene Krokodile für die Mumifizierung ist auch eine Möglichkeit. Eine aktuelle forensische Untersuchung des Mageninhalts und der Todesursache eines etwas kleinere mumifizierte Krokodil aus Kom Ombo zeigt, dass es aus der Wildnis gejagt wurde ([Porcier et al., 2019](#)). In Abwesenheit von greifbare Beweise bezüglich der ökologischen und Habitataufteilung zwischen *C. suchus* und *C. niloticus*, ein besseres Verständnis des Lebensraums Variabilität im ägyptischen Nil-Wassereinzugsgebiet während dieser Zeitspanne würde zumindest Hypothesen über die spezifischen Eigenschaften der beiden Arten erleichtern Verteilungen.

Obwohl die Bestätigung, ob adulte oder geschlüpfte *C. suchus*-Individuen waren am ägyptischen Nil heimisch oder wurden für die Verwendung in Schläfen werden zusätzliche Probenahmen sowohl von paläontologischen als auch von bioarchäologischen Kontexten, die mitogenomischen Daten von einem Krokodil Die hier vorgestellte Mumie trägt zu unserem Verständnis der menschlichen Tierinteraktionen im Kontext der historischen Biogeographie und Klimawandel. Genomische Analysen von Krokodilproben aus früheren paläontologischen Kontexten in der Region des Fayum und anderen ägyptischen Standorte könnten die relativen Einflüsse des rezenten Klimas weiter aufklären Wandel gegenüber sich verändernden anthropogenen kulturellen Praktiken über die letzten Jahrtausenden auf die Verbreitung dieser Art in Ägypten.

7. Schlussfolgerungen

Wie Geoffroy Saint-Hilaire vor zwei Jahrhunderten vorschlug, können Tiere Mumien können einen Rahmen für das Verständnis bieten, wie Arten auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Neue Methoden der Sequenzierung Erfassung und Hochdurchsatz-Sequenzierung mittels Next-Generation Sequenzierungstechnologien (NGS) ermöglichen nun die Rekonstruktion von alte Mitogenome aus ausgestorbenen Populationen von Wildtieren und aus bioarchäologischen Materialien ([Vilstrup et al., 2013](#)). Kürzlich alt genomische und bioinformatische Methoden haben es ermöglicht, die empirische Nachweis von Veränderungen an den Genomen und Verteilungen von Wildtierpopulationen, da der Mensch die globale Landschaft verändert hat ([Johnson und Munshi-South, 2017](#)).

Finanzierung

Die Finanzierung wurde von der Graduate School of Arts and Sciences der Fordham University über ein Faculty Research Grant an ERH. Musterkollektion in Guinea, Gambia und Ägypten wurde von Conservation, Food zur Verfügung gestellt, and Health Foundation, die Columbus Zoological Park Association, Inc. Conservation Fund, IDEA WILD, St. Augustine Alligator Farm, Rotary International, IUCN/SSC Crocodile Specialist Group, AZA Crocodilian

Beratungsgruppe, Minnesota Zoo, Fresno Chaffee Zoo, San Diego Zoological Gesellschaft, Conservation Leadership Programme-Future Conservationist Auszeichnung, Conservation Leadership Programme-Mentoring Award.

Autorenbeiträge

EH, SI, OS und MTPG konzipierten die Studie. EH und OS führten durch Laborarbeiten und Analysen und schrieb das Manuskript. MHS und KAV lieferten Proben und trug zum Schreiben und Entwickeln von Manuskripten bei. SWC steuerte Verteilungsdaten und Nischenmodellierungshintergrund bei für *C. suchus*. MA und AN führten Datenanalysen durch und schrieben Teile des Manuskripts. SI führte die Probenrecherche durch und schrieb Teile des Manuskripts. GA und MTPG stellten Labor und Logistik zur Verfügung Unterstützung und trug redaktionelle Unterstützung zum Manuskript bei.

Danksagungen

Wir möchten uns bei S. Gopalakrishnan für die bioinformatische Unterstützung bedanken. Wir danken D. Kizirian und den Mitarbeitern in der Abteilung für Herpetologie und die Ambrose Monell Cryo Collection am AMNH für Zugang zu Proben und Probenahme. Wir danken M. Jallow, K. Ingenloff, L. Paziaud, M. Selinske, S. Aucoin, und die Mitglieder des Krokodil Management Unit und die südlichen Gebietsschutzgebiete des Natur Naturschutzsektor der ägyptischen Umweltbehörde (EEAA) für die Hilfe bei der Sammlung von Krokodilblutproben in Gambia, Guinea, und Ägypten. Wir danken der EEAA, A. Jallow vom Dept. of Parks und Wildtiermanagement (Gambia), und das Ministere des Eaux et Forets (Guinea) für die Erlaubnis, diese Proben zu sammeln und zu exportieren. Wir danken der St. Augustine Alligator Farm Zoological Park-SAAF für zeitgenössische Krokodilproben. Schließlich bedanken wir uns bei S. Gratzner und A. Gratzner, im Naturhistorischen Museum des Salzkammergutes, Österreich (NMSG-A) und M. Unruh, im Universalmuseum Joanneum, Naturkundemuseum im Joanneumsviertel für Provenienzforschung und Zugang zu Mumiengewebeproben. Wir danken U. E. Schneppat für die Koordination der Mumientnahme und für das Bringen des Salzkammergutes Mutti auf uns aufmerksam.

Anhang A. Ergänzende Daten

Ergänzende Daten zu diesem Artikel finden Sie online unter <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102483>.

Referenzen

- Altekar, G., Dwarkadas, S., Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2004. Parallele Metropole gekoppelte Markov-Ketten-Monte Carlo für Bayes'sche phylogenetische Inferenz. *Bioinformatik* 20 (3), 407-415.
- Bresciani, E., 2015. Sobek, Herr über das Land des Sees. In: *Divine Creatures: Tier Mummies in Ancient Egypt*. American University in Cairo Press, Kairo, S. 199-206.
- Brito, J.C., Martínez-Freiría, F., Sierra, P., Sillero, N., Tarroso, P., 2011. Krokodile in der Wüste Sahara: eine Aktualisierung der Verbreitung, der Lebensräume und des Populationsstatus für den Schutz Planung in Mauretanien. *PLoS One* 6 (2), e14734.
- Brito, J.C., Godinho, R., Martínez-Freiría, F., Pleguezuelos, J.M., Rebelo, H., Santos, X.,

Vale, C.G., Velo-Antón, G., Boratyński, Z., Carvalho, S.B., Ferreira, S., 2014. Entschlüsselung der Biodiversität, der Evolution und der Bedrohungen für den Naturschutz in der Sahara-Sahelzone. *Biol. Rev.* 89 (1), 215-231.

Briggs, A.W., Stenzel, U., Johnson, P.L.F., Green, R.E., Kelso, J., Prüfer, K., Meyer, M., Krause, J., Ronan, M.T., Lachmann, M., Pääbo, S., 2007. Muster von Schäden in genomische DNA-Sequenzen aus einem Neandertaler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14616–14621.

Carøe, C., Gopalakrishnan, S., Vinner, L., Mak, S.S.T., Sinding, M.H.S., Samaniego, J.A., Wales, N., Sicheritz-Pontén, T., Gilbert, M.T.P., 2017. Single-tube library preparation für degradierte DNA. *Methods Ecol. Evol.* 9, 410-419.

Cunningham, S.W., 2015. Räumliche und genetische Analysen von Afrikas heiligem Krokodil: *Crocodylus suchus*. M.S. Dissertation. ETD-Sammlung für die Fordham University. AAI1584730. <https://fordham.bepress.com/dissertations/AAI1584730>.

Cunningham, S.W., Shirley, M.H., Hekkala, E.R., 2016. Feinskalige Muster der genetischen Aufteilung beim wiederentdeckten afrikanischen Krokodil, *Crocodylus suchus* (Saint-Hilaire 1807). *PeerJ* 12 (4), e1901.

Curtis, C., Millar, C.D., Lambert, D.M., 2018. Die Sacred Ibis Debatte: der erste Test von Evolution. *PLoS Biol.* 16 (9), e2005558. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005558> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30260949/>.

Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M.-T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., García, N., Pääbo, S., Arsuaga, J.-L., Meyer, M., 2013. Vollständige mitochondriale Genomsequenz eines mittelpleistozänen Höhlenbären rekonstruiert aus Ultrakurzzeit DNA-Fragmente. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15758-15763.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. **jModelTest 2: more models, neue** Heuristiken und paralleles Rechnen. *Nat. Methods* 9, 772.

de Smet, K., 1998. Status des Nilkrokodils in der Sahara-Wüste. *Hydrobiologia* 391, 81–86.

Drake, N.A., Blench, R.M., Armitage, S.J., Bristow, C.S., White, K.H., 2011. Alte Wasserläufe und Biogeographie der Sahara erklären die Besiedlung der Wüste. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2), 458-462.

Drosou, K., Price, C., Brown, T.A., 2018. Die Verwandtschaft von zwei Mumien aus der 12. aufgedeckt durch antike DNA-Sequenzierung. *J. Archaeol. Sci. Rep.* 17, 793-797.

Dowell, S.A., Hekkala, E.R., 2016. Divergente Abstammungslinien und konservierte Nischen: mit ökologischen Nischenmodellierung zur Untersuchung der evolutionären Muster des Nilwarans (*Varanus niloticus*). *Evol. Ecol.* 30 (3), 471–485.

Dowell, S.A., Portik, D.M., de Buffrénil, V., Ineich, I., Greenbaum, E., Kolokotronis, S.O., Hekkala, E.R., 2016. Molekulare Daten aus zeitgenössischen und historischen Sammlungen enthüllen eine komplexe Geschichte der kryptischen Diversifizierung bei *Varanus* (Polydaedalus) *niloticus* Artengruppe. *Mol. Phylogenet. Evol.* 94, 591-604.

E.R. Hekkala, et al. Journal of Archaeological Science: Berichte 33 (2020) 102483

Egerer, S., Claussen, M., Reick, C.H., 2018. Rascher Anstieg der simulierten nordatlantischen Staubablagerung aufgrund der schnellen Veränderung der nordwestafrikanischen Landschaft während des Holozäns. *Clim. Vergangenheit* 14, 1051-1066.

Enk, J.M., Devault, A.M., Kuch, M., Murgha, Y.E., Rouillard, J.M., Poinar, H.N., 2014. Anreicherung antiker Ganzgenome mit Ködern, die aus moderner DNA aufgebaut sind. *Mol. Biol. Evol.* 31 (5), 1292-1294.

Geoffroy Saint-Hilaire, É., 1807. Description de deux crocodiles qui existent dans le Nil, comparés au crocodile de Saint-Domingue. *Muséum National d'Histoire Naturelle*.

Gilbert, M.T.P., Barnes, I., Collins, M.J., Smith, C., Eklund, J., Goudsmit, J., Poinar, H., Cooper, A., 2005. Langzeitüberleben von antiker DNA in Ägypten: Antwort auf Zink und Nerlich (2003). *Am. J. Phys. Anthropol.* 128, 110–114.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. Eine einfache, schnelle und genaue Methode zur Schätzung großer Phylogenien durch Maximum-Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.

Hekkala, E.H., Shirley, M.H., Amato, G., Austin, J.D., Charter, S., Thorbjarnarson, J., Blum, M.J., 2011. Eine uralte Ikone gibt neue Rätsel auf: Mumien-DNA erweckt ein kryptische Arten innerhalb des Nilkrokodils. *Mol. Ecol.* 20 (20), 4199–4215.

Ikram, S., 2015. *Göttliche Kreaturen: Animal Mummies in Ancient Egypt*. Amerikanisch University in Cairo Press, Kairo.

Ikram, S., Iskander, N., 2002. *Gesamtkatalog der nicht-menschlichen Mumien im Ägyptisches Museum*. Oberster Rat der Altertümer, Kairo.

Johnson, M., Munshi-Süd, J., 2017. Evolution des Lebens in urbanen Umgebungen. *Wissenschaft* 358, eaam8327. <https://doi.org/10.1126/science.aam8327>.

Jomard, E. F., Jacotin, P., 1818. *Description de l'Égypte, ou Recueil des observations et recherches qui ont été faites en Égypte pendant l'expédition de l'armée Française: Antiquités, Beschreibungen; 2 (Tafel 55)*.

Jonsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P.L., Orlando, L., 2013. mapDamage2.0: schnelle approximative Bayes'sche Schätzungen von alten DNA-Schadensparametern. *Bioinformatik* 29, 1682–1684.

Kpera, N., 2003. Anmerkungen zu Krokodilen in Benin. *Krokodil Spezial. Group Newslet.* 22, 3.

Kurushima, J.D., Ikram, S., Knudsen, J., Bleiberg, E., Grahn, R.A., Lyons, L.A., 2012. Katzen der Pharaonen: genetischer Vergleich von ägyptischen Katzenmumien mit ihren katzenartigen Zeitgenossen. *J. Archaeol. Sci.* 39 (10), 3217–3223.

Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., Calcott, B., 2016. PartitionFinder 2: neue Methoden zur Auswahl partitionierter Evolutionsmodelle für molekulare und morphologische phylogenetische Analysen. *Mol. Biol. Evol.* 34, 772–773.

Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methoden* 9, 357.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., 2007. Clustal W und Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.

Le Guyader, H., 2004. *Etienne Geoffroy Saint-Hilaire, 1772-1844: Ein visionärer Naturforscher*. University of Chicago Press, Chicago.

Li, H., 2011. Verbesserung der SNP-Entdeckung durch die Qualität der Basenausrichtung. *Bioinformatik* 27, 1157–1158.

Li, H., 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWAMEM. [arXiv:1303.3997v2 \[q-bio.GN\]](https://arxiv.org/abs/1303.3997v2).

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.

Lorenzen, E. D., Willerslev, E., 2010. Die Familie von König Tutanchamun und sein Untergang. *JAMA* 303, 2471–2475.

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., DePristo, M.A., 2010. Das Genom Analyse-Toolkit: ein MapReduce-Framework zur Analyse von DNA-Sequenzierung der nächsten Generation Daten. *Genome Res.* 20, 1297–1303.

Martin, M., 2011. Cutadapt entfernt Adapter-Sequenzen aus der Hochdurchsatz-Sequenzierung liest. *EMBnet. J.* 17 (1), 10–12.

Meyer, M., Kircher, M., 2010. Illumina Sequenzierbibliothekspräparation für hochmultiplexe

Target Capture und Sequenzierung. Cold Spring Harb. Protocols 2010 (6) pdbrot5448.

Moiser, C.M., Barber, A.D., 1994. Die Krokodilbecken der Western Division, Die Gambia. British Herpetol. Soc. Bull. 47, 16–22.

Molcho, M., 2014. Krokodilzucht in den Krokodilkulten des griechisch-römischen Fayum. J. Egypt. Archaeol. 100 (1), 181–193.

Nicolas, V., Mataame, A., Crochet, P.A., Geniez, P., Fahd, S., Ohler, A., 2018. Phylogeographie und ökologische Nischenmodellierung enträtseln die Evolutionsgeschichte von die Afrikanische Wechselkröte, *Bufo boulengeri boulengeri* (Amphibia: Bufonidae), durch das Quartär. J. Zool. Syst. Evol. Res. 56 (1), 102–116.

Porcier, S.M., Berruyer, C., Pasquali, S., Ikram, S., Berthet, D., Tafforeau, P., 2019. Wild Krokodile, die im römischen Ägypten zur Herstellung von Mumien gejagt wurden: Beweise aus Synchrotron Abbildung. J. Archaeol. Sci. 110, 105009.

Richardin, P., Porcier, S., Ikram, S., Louarn, G., Didier, B., 2017. Katzen, Krokodile, Rinder, and More: erste Schritte zur Erstellung einer Chronologie der altägyptischen Tiermumien. Radiocarbon 59, 595–607.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesianische phylogenetische Inferenz unter gemischte Modelle. Bioinformatik 19, 1572–1574.

Schmitz, A., Mansfeld, P., Hekkala, E., Shine, T., Nickel, H., Amato, G., Böhme, W., 2003. Molekulare Beweise für Divergenz auf Artniveau bei afrikanischen Nilkrokodilen *Crocodylus niloticus* (Laurenti, 1786). C.R. Palevol. 2 (8), 703–712.

Shirley, M.H., Dorazio, R., Abassery, E., El Hady, A.A., Mekki, M.S., Asran, H.H., 2012. A Stichprobendesign und Modell zur Abschätzung der Abundanz von Nilkrokodilen unter Berücksichtigung für die Heterogenität der Erkennbarkeit von mehreren Beobachtern. J. Wildlife Manage. 76 (5), 966–975. <https://doi.org/10.1002/jwmg.348>.

Shirley, M.H., Villanova, V.L., Vliet, K.A., Austin, J.D., 2015. Genetische Barcodierung erleichtert Management in Gefangenschaft und in freier Wildbahn von drei kryptischen afrikanischen Krokodilartenkomplexen. Anim. Conserv. 18 (4), 322–330.

Siege, L., Koch, C., 2017. Systematischer Status der Krokodile im Einzugsgebiet des Awash River. Krokodil Spezial. Gruppen-Newsletter. 36 (4), 24–27.

Smith, O., Momber, G., Bates, R., Garwood, P., Fitch, S., Pallen, M., Gaffney, V., Allaby, R.G., 2015. Sedimentäre DNA von einer überfluteten Stelle enthüllt Weizen auf den Britischen Inseln Vor 8000 Jahren. Wissenschaft 347, 998–1001.

Stamatakis, A., 2014. RAxML Version 8: ein Werkzeug für phylogenetische Analysen und Post-Analysen von großen Phylogenien. Bioinformatics 30, 1312–1313.

Tavaré, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lekt. Math. Life Sci. 17 (2), 57–86.

Toonen, H., 2003. Die heiligen Krokodile von Bazoule. Krokodil Spezial. Group Newslett. 22, 4.

Velo-Antón, G., Godinho, R., Campos, J.C., Brito, J.C., 2014. Soll ich bleiben oder soll ich gehen? Ausbreitung und Populationsstruktur in kleinen, isolierten Wüstenpopulationen von West Afrikanische Krokodile. PLoS One 9 (4), e94626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094626>.

Vilstrup, J.T., Seguin-Orlando, A., Stiller, M., Ginolhac, A., Raghavan, M., Nielsen, S.C.A., Weinstock, J., Froese, D., Vasiliev, S.K., Ovodov, N.D., Clary, J., 2013. Mitochondrial Phylogenomics of Modern and Ancient Equids. PLoS One 8, e55950.

Wasef, S., Wood, R., El Merghani, S., Ikram, S., Curtis, C., Holland, B., Willerslev, E., Millar, C.D., Lambert, D.M., 2015. Radiokohlenstoff-Datierung von Mumien des Heiligen Ibis aus alten Ägypten. J. Archaeol. Sci. Rep. 4, 355–361.

Woodman, N., Koch, C., Hutterer, R., 2017. Wiederentdeckung der Typenreihe des Sacred Spitzmaus, *Sorex religiosus* I. Geoffroy Saint-Hilaire, 1826, mit zusätzlichen Anmerkungen zu

[mumifizierte Spitzmäuse aus dem alten Ägypten \(Mammalia: Soricidae\)](#). *Zootaxa* 4341 (1), 1-24.

E.R. Hekkala, et al. Journal of Archaeological Science: Berichte 33 (2020) 102483

10