

Полногеномный анализ древней ДНК позволил уточнить филогеографию пещерных гиен в Северной Евразии

Боцманов Е.И.^{1*}, Иванова А.О.¹, Крицкий А.А.¹, Павлова А.В.¹, Прокопьев Н.А.¹, Цедилина Т.Р.¹, Гимранов Д.О.², Хантемиров Д.Р.³, Маликов Д.Г.⁴, Климук Е.И.¹, Северинов К.В.¹

¹ ООО «Биотехнологический кампус», Москва, Россия

² Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

³ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

⁴ Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН, Новосибирск, Россия

* ebotsmanov@biotc.ru

Ключевые слова: палеогеномика; филогенетика; биоинформатика; гиены; древняя ДНК

Мотивация и цель: Пещерные гиены, населявшие большие области Евразийского континента вплоть до позднего плейстоцена, в силу значимых генетических и морфологических различий в литературе часто делятся на два вида: «европейский» (*Crocota spelaea*) и «азиатский» (*C. ultima*) [1]. При этом взаимоотношение между видами рода *Crocota* остается спорным и не до конца изученным. В частности, отсутствуют в достаточном количестве генетические данные для популяций, населявших центральную часть Северной Евразии. В настоящей работе были исследованы полные геномы двух особей рода *Crocota* (ИЭРЖ 3220/2242 и ИЭРЖ 3220/2243), найденных в пещере Инейская (Республика Хакасия).

Методы и алгоритмы: Все работы с древней ДНК проводились в специальном «чистом» помещении на базе геномного центра «Биотехнологический Кампус» в соответствии со стандартными протоколами. Выделение древней ДНК было осуществлено в соответствии с протоколом Rohland et al., 2018 [2]. Для обеих особей были получены парноконцевые прочтения длиной 75 bp на платформе DNBSEQ-T7. Биоинформатический анализ проводили с использованием программ “FastP”, “bwa”, “angsd”. Аутентификация древней ДНК по специфическим паттернам повреждений осуществлялась при помощи “MapDamage2”. Для филогенетического анализа была использована программа “iqtree”. Для визуализации результатов использовали пакет seaborn (python) и itol. Среднее покрытие ядерного генома составило 2.19X и 0.81X для 3220/2242 и 3220/2243 соответственно.

Результаты: Филогенетический анализ митохондриальной ДНК позволил однозначно отнести обе особи к древней ветви гаплогруппы А (рис. 1). Этот результат косвенно подтверждает широкое распространение гаплогруппы А в центре Евразии, ранее показанное на примере пещерной гиены из Денисовой пещеры [3]. На основе новых и ранее опубликованных [4] данных полногеномного секвенирования проведен анализ главных компонент, позволяющий отнести обе особи из пещеры Инейская к виду *C. ultima* (рис. 2). Полученный результат соотносится с наблюдаемыми морфологическими отличиями [5].

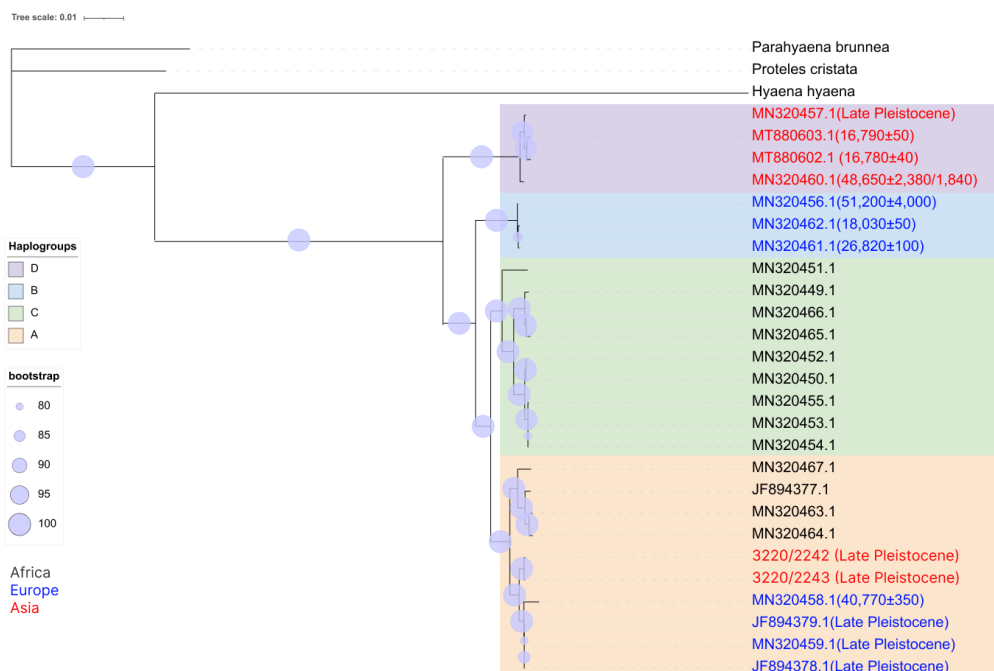


Рис. 1. Филогенетическое дерево представителей рода *Crocota*, построенное на основе митохондриальных геномов. В качестве аутгруппы взяты *Parahyaena brunnea*, *Hyiena hyaena*, *Proteles cristatus*. Синими кругами обозначены бутстрепы, определяющие статистическую достоверность дерева. Цветами клад обозначены ранее определенные гаплогруппы A, B, C, D [4, 6]. Текст выделен в соответствии с локацией исследованного образца. Для ископаемых образцов в скобках указана дата. Дерево построено методом максимального правдоподобия, модель замен – TPM2u+F+I+G4

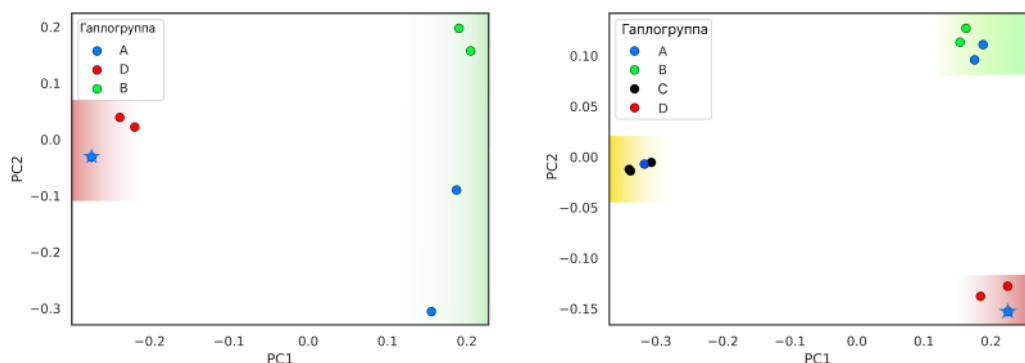


Рис. 2. Анализ главных компонент на основе ядерных однонуклеотидных полиморфизмов: слева – только для ископаемых образцов, справа – включая полные геномы современных пятнистых гиен. Особь 3220/2242 выделена звездочкой. Цвет точек соответствует ранее определенным митохондриальным гаплогруппам. Цвет закрашенных областей отражает принадлежность к следующим видам: желтый – современные *C. crocuta*, красный – *C. ultima*, зеленый – *C. spelaea*

Выводы: Результаты полногеномного секвенирования впервые подтверждают более широкое распространение вида *C. ultima* в центре Северной Евразии в позднем плейстоцене. Несоответствие результатов ядерного и митохондриального

филогенетического анализа может демонстрировать более тесные контакты *C. ultima* и *C. spelaea*, а также возможность продолжительного существования гибридных форм в зоне контакта их ареалов.

Финансирование: Исследование поддержано ООО «Биотехнологический кампус» и государственным заданием ИГМ СО РАН (№ 122041400243-9).

Whole genome sequencing of ancient DNA clarifies the phylogeography of cave hyenas in Northern Eurasia

Botsmanov E.^{1*}, Ivanova A.¹, Kritsky A.¹, Pavlova A.¹, Prokopev N.¹, Tsedilina T.¹, Gimranov D.², Khantemirov D.³, Malikov D.⁴, Klimuk E.¹, Severinov K.¹

¹ "Biotech Campus" LLC, Moscow, Russia

² Institute of Plant and Animal Ecology, UB RAS, Ekaterinburg, Russia

³ Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia

⁴ V.S. Sobolev Institute of Geology and Mineralogy, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* ebotsmanov@biotc.ru

Key words: paleogenomics; phylogenetics; bioinformatics; hyenas; ancient DNA

Motivation and Aim: Cave hyenas, which inhabited large areas of the Eurasian continent until the late Pleistocene, are often divided into two species, European (*Crocota spelaea*) and Asian (*C. ultima*), due to significant genetic and morphological differences [1]. The relationship between these species remains controversial and not fully understood. In particular, sufficient genetic data are lacking for populations that inhabited the central part of Northern Eurasia. In this work, the whole genomes of two animals of the genus *Crocota* (IPAE 3220/2242 and IPAE 3220/2243) found in the Ineyskaya cave (Republic of Khakassia) were investigated.

Methods and Algorithms: All work with ancient DNA was carried out in a clean room facility at the Biotech Campus genomic center in accordance with standard protocols. The isolation of ancient DNA was performed according to the protocol of Rohland et al., 2018 [2]. For both samples, DNA libraries were prepared according to MGI protocol, and 75 bp paired-end reads were obtained on the DNBSEQ-T7 platform. Bioinformatics analysis was performed using the software tools "FastP", "bwa", and "angsd". Authentication of ancient DNA by specific damage patterns was carried out using the "MapDamage2" package. The "iqtree" tool was used for phylogenetic analysis. The package "seaborn" (python) and "itol" were applied for the results visualization. The nuclear genome mean coverage was 2.19X and 0.81X for 3220/2242 and 3220/2243 respectively.

Results: Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA allowed unambiguously assign both individuals to the ancient branch of haplogroup A (Fig. 1). The same haplogroup was observed for a cave hyena from Denisova Cave [3]. Thus, haplogroup A was widely distributed the center of Eurasia. On the basis of new and previously published whole-genome sequencing data [4], we performed a principal component analysis, which allowed both animals from the Ineyskaya Cave to be classified as *C. ultima* (Fig. 2), which correlates with observed morphological data [5].

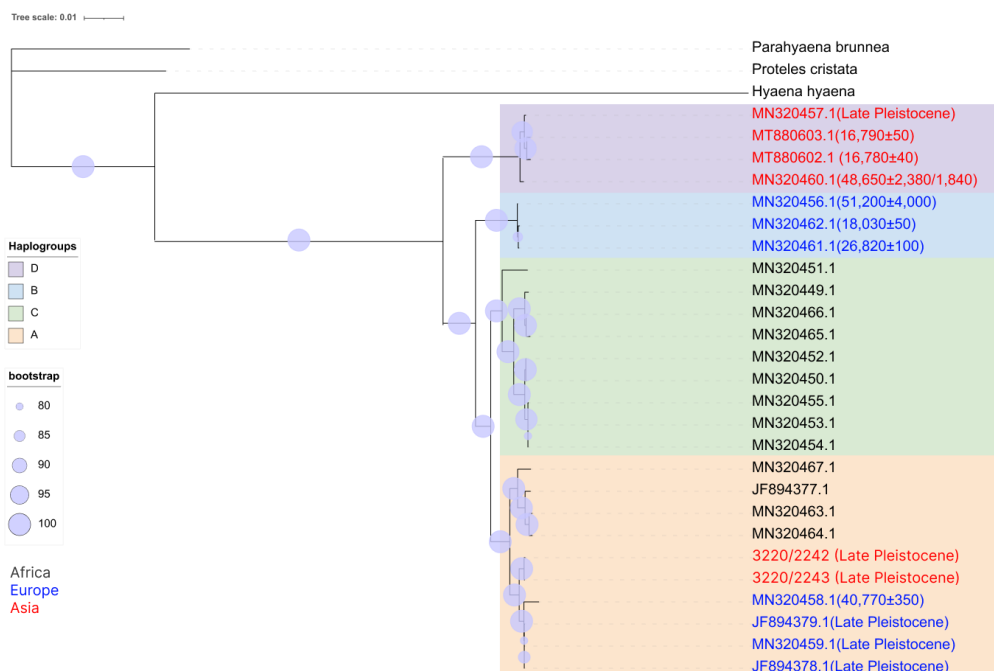


Fig. 1. Phylogenetic tree of representatives of the genus *Crocota* based on mitochondrial genomes. *Parahyaena brunnea*, *Hyaena hyaena*, *Proteles cristatus* are taken as outgroups. Blue circles indicate bootstraps defining the statistical confidence of the tree. Clade colors indicate previously defined haplogroups: A, B, C, D [4, 6]. Text is highlighted according to the location of the studied sample. For fossil specimens, the date is indicated in parentheses. The tree was constructed by the maximum likelihood method, the substitution model is TPM2u+F+I+G4

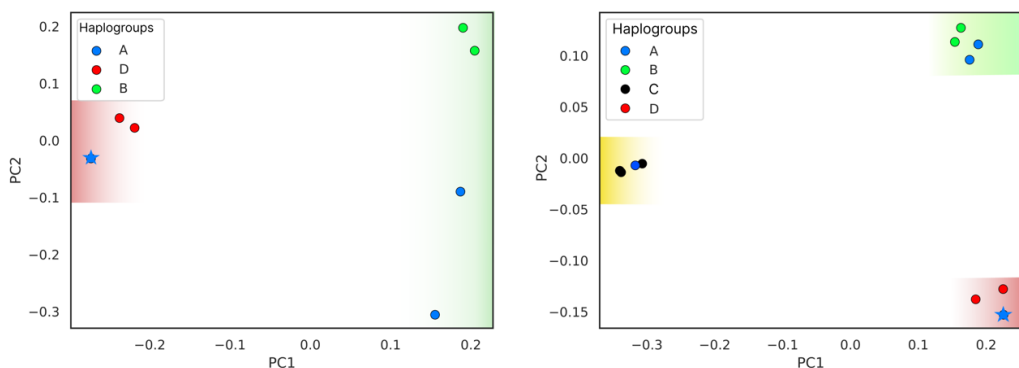


Fig. 2. Principal component analysis based on nuclear single nucleotide polymorphisms. The figure on the left is for fossil specimens only, the figure on the right includes the complete genomes of modern spotted hyenas. Individual 3220/2242 is marked as a star symbol. The color of the dots corresponds to previously defined mitochondrial haplogroups. The color of the shaded areas reflects the following species: Yellow – modern *C. crocuta*, Red – *C. ultima*, Green – *C. spelaea*

Conclusion: The results of whole-genome sequencing show wide distribution of *C. ultima* species in the center of Northern Eurasia during the Late Pleistocene. The discrepancy between the results of nuclear and mitochondrial phylogenetic analysis may

indicate closer contacts between *C. ultima* and *C. spelaea*, as well as a possibility of prolonged existence of hybrid forms in the contact zone of their ranges.

Funding: The study was supported by Biotech Campus LLC and the state assignment of IGM SB RAS (No. 122041400243-9).

Список литературы/References

1. Lewis M., Werdelin L. A revision of the genus *Crocota* (Mammalia, Hyaenidae). *Palaeontogr Abt A Palaeozool Stratigr.* 2022;322:1-115. doi 10.1127/pala/2022/0120
2. Rohland N., Glocke I., Aximu-Petri A., Meyer M. Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing. *Nat Protoc.* 2018;13(11):2447-2461. doi 10.1038/s41596-018-0050-5
3. Rohland N., Pollack J.L., Nagel D., Beauval C., Airvaux J., Pääbo S., Hofreiter M. The population history of extant and extinct hyenas. *Mol Biol Evol.* 2005;22(12):2435-2443. doi 10.1093/molbev/msi244
4. Westbury M.V., Hartmann S., Barlow A. et al., Hyena paleogenomes reveal a complex evolutionary history of cross-continental gene flow between spotted and cave hyena. *Sci Adv.* 2020;6:eaay0456. doi 10.1126/sciadv.aay0456
5. Хантемиров Д.Р., Маликов Д.Г., Гимранов Д.О. Пещерная гиена *Crocota* cf. *ultima* из пещеры Инейская (Хакасия). В: Закономерности эволюции и биостратиграфия. Материалы LXX сессии Палеонтологического общества РАН. СПб.: Картфабрика ин-та Карпинского, 2024
6. Sheng G.L., Soubrier J., Liu J.Y. et al. Pleistocene Chinese cave hyenas and the recent Eurasian history of the spotted hyena, *Crocota crocuta*. *Mol Ecol.* 2014;23(3):522-533. doi 10.1111/mec.12576