

## Türkiye Anadolu Eşeği (*Equus asinus*)'nin Mitogenom Karakterizasyonu ve Filogenetik İlişkileri

Osman İBİŞ\*

Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 23.05.2019

Kabul Tarihi/Accepted: 19.09.2019

ORCID ID

[orcid.org/0000-0001-5000-7882](https://orcid.org/0000-0001-5000-7882)

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: [ibis.osman@gmail.com](mailto:ibis.osman@gmail.com)

**Öz:** Bu çalışmanın amacı, Türkiye Anadolu eşeği (*Equus asinus*)'nin ilk mitogenom karakterizasyonunu yapmak ve filogenetik ilişkilerinin ortaya çıkarılmasına katkı sağlamaktır. Anadolu eşeğine ait bir örneğin komple mitokondriyal genomu, Long-Range PCR ve Yeni Nesil Dizileme tekniği ile karakterize edilmiş ve Bayesian, Maksimum Likelihood ve Neighbor-Joining metodlarıyla filogenetik analizler yapılmıştır. Komple mitogenom, 13 protein kodlayan gen, 22 taşıyıcı RNA, 2 ribozomal RNA ve bir kodlama yapmayan kontrol bölgesi (D-loop) içeren, 16.551 baz çifti uzunluğunda tipik dairesel DNA moleküldür. Mitogenomun ortalama nükleotid kompozisyonu, memeli mitogenomları aralığında olup; adenin için % 32.32, timin için % 25.78, sitozin için % 28.67, guanin için % 13.23'tür; adenin+timin içeriği (% 58.10), guanin+sitozin içeriğinden (% 41.90) daha fazladır. Toplam 14 taşıyıcı RNA, 12 protein kodlayan ve 2 ribozomal RNA geni ağır zincir üzerinde kodlanmakta, 8 taşıyıcı RNA ve bir protein kodlayan gen (ND6) ise hafif zincir üzerinde kodlanmaktadır. Gen yapısı, organizasyonu ve kompozisyonu diğer atgillere benzerdir. Filogenetik analizler, Türkiye Anadolu eşeğinin, Çin evcil eşeklerine Avrupa evcil eşeklerinden daha yakın olduğunu ve Afrika yabani eşeklerinden (Somali yabani eşeği gibi) köken almış olabileceğini göstermiştir. Bu çalışma, Türkiye eşekleri ve diğer atgilleri içeren gelecekteki moleküler çalışmalar için Anadolu eşeğinin referans mitogenom verisini sunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Equus asinus*, Yeni Nesil Dizileme, mtDNA, filogeni

## Mitogenome Characterization of Turkish Anatolian Donkey (*Equus asinus*) and Its Phylogenetic Relationships

**Abstract:** The aim of this study was to characterize first mitogenome of Anatolian donkey in Turkey and to contribute to revealing its phylogenetics relationships. Whole mitogenome belonging to one sample of the Anatolian donkey was characterized with Long-Range PCR and Next-Generation Sequencing technique and phylogenetic analyses were performed using Bayesian, Maximum Likelihood and Neighbor-Joining methods. The complete mitogenome is a typical circular DNA molecule of 16.551 base pair in length that contained 13 protein coding genes (PCGs), 22 transfer RNA, two ribosomal RNA genes, and one non-coding control region (D-loop). The average nucleotide composition of the mitogenome is in the range of mammalian mitogenomes; 32.32% for adenine, 25.78% for thymine, 28.67% for cytosine and 13.23% for guanine; adenine + thymine content (58.10%) was higher than guanine + cytosine content (41.90%). A total of 14 transfer RNA, 12 protein coding and 2 ribosomal RNA genes were encoded on the heavy strand, and 8 transfer RNA and one protein coding (ND6) gene were encoded on the light strand. The gene structure, organization and compositions were similar to other equids. Phylogenetic analyses indicated that the Turkish Anatolian donkey was closer to the Chinese domestic donkey rather than to the European domestic donkeys, and it may have originated from the African wild donkeys (such as Somali wild donkey). This study provided reference mitogenomic data of Anatolian donkey for further molecular studies of the Turkish donkeys and other equids.

**Keywords:** *Equus asinus*, Next-Generation Sequencing, mtDNA, phylogeny

## 1. Giriş

Mammalia sınıfının Perissodactyla takımı içerisinde yer alan Equidae familyası, günümüzde sadece *Equus* cinsini içermektedir. Bu cins içerisinde; atlar (*Equus caballus*), eşekler [*E. asinus* (eşek), *E. hemionus* (kulan/Asya yaban eşiği), *E. kiang* (kiang/Tibet yaban eşiği)] ve zebra [*E. zebra* (dağ zebra), *E. grevyi* (grevy zebra), *E. burchellii* (Burchell zebra), *E. quagga* (quagga/bayağı zebra)] olmak üzere toplam 8 herbivor türü yer almaktadır (Wilson ve Reeder, 2005). Evcil atgiller insan etkisiyle dünya çapında oldukça geniş bir yayılış alanına sahip iken yabani atgiller, çoğunlukla Doğu Afrika'da ve Yakın Doğu'dan Moğolistan'a kadar olan bölgedeki geniş çayırlıklara erişimi olan yerlerde yayılış gösterirler (Huggins, 2002). Türkiye'de evcil *E. caballus* (at) ve *E. asinus* (eşek) üyeleri bulunmaktadır (Yılmaz ve Wilson, 2013; Yılmaz ve Ertuğrul, 2014). Eşek (*E. asinus*) türünün *E. asinus asinus* (evcil eşek), *E. asinus africanus* (Afrika yabani eşiği/Nubian yabani eşiği) ve *E. asinus somalicus* (Somali yabani eşiği) olmak üzere üç alt türü bulunmaktadır (Huggins, 2002; Wilson ve Reeder, 2005). Bazı araştırmacılar, evcil eşiğin (*E. africanus asinus*), Nubian yabani eşiği (*E. africanus africanus*) ve Somali yabani eşiği (*E. africanus somalicus*) ile birlikte Afrika yabani eşiği (*E. africanus*)'nin bir alt türü olduğu şeklinde değerlendirme yapmaktadırlar (Cozzi ve ark., 2018).

Eşiğin doğal yayılış alanı, Kuzey Afrika ve Arap Yarımadası'dır. Ancak günümüzde evcil ve yabani eşekler, insan müdahalesiyle tüm dünyaya yayılmıştır. Eşiğin evcilleştirilme süreci, zooarkeolojik, etnografik ve yakın zamandaki genetik verilerle birlikte tartışmalı bir konu olmuştur (Clutton-Brock, 1992). Eşek için evcilleştirme merkezleri ve evcilleştirmeye hangi soy hatlarının katkıda bulunduğu hala tam anlamıyla bilinmemektedir (Beja-Pereira ve ark., 2004; Yılmaz ve Ertuğrul, 2011; Kul ve ark., 2016). Bununla birlikte Levant (Filistin Bölgesi) ve Arap Yarımadası'ndan *E. africanus*'a ait olduğu varsayılan kalıntıların tanımlanması nedeniyle eşiğin Batı Asya'da evcilleştirilmiş olma ihtimali üzerinde durulmaktadır (Clutton-Brock 1992; Rosenbom ve ark., 2015).

Eşekler yakın geçmişe kadar tarım uygulamalarında oldukça önemli bir rol oynamıştır ve günümüzde de hala yetiştiriciliği yapılan diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de özellikle kırsal kesimlerde taşımacılık ve ulaşım için kullanılmaktadır (Yılmaz ve Wilson, 2013; Cozzi ve ark., 2018). Dünyadaki eşek popülasyonunun

büyük bir kısmı, iş gücünden yararlanılmak ve at ile melezlenerek katır ve bardo üretmek için gelişmekte olan ülkelerde ve Çin'de bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerdeki sayısı ise tarım ve ulaşımdaki makineleşmeye bağlı olarak hızla azalmaktadır (Anonymous, 2019). Bununla birlikte, inek sütüne karşı alerji durumlarında alternatif süt kaynağının elde edilmesi, kozmetik uygulamalar için süt türevi ürünlerinin üretilmesi, et üretimi, rekreasyon ve turistik faaliyetler günümüzde eşek yetiştirme nedenleri arasındadır (Bertolini ve ark., 2015).

*Equus* cinsi üyeleri, çok çalışılan türler arasında olmasına karşın evcil eşekler cins içerisinde dünyada ve Türkiye'de göreceli olarak en az çalışılan ve ihmal edilen evcil hayvan grubudur (Cozzi ve ark., 2018). Eşekler, Anadolu coğrafyasının evcil hayvan gruplarının eski bir bileşenini oluşturmuş ve bölge ekonomisine yüzyıllarca önemli katkı sağlamış; 1960'lı yıllardan sonra eşek yetiştiriciliği hızla azalmıştır (Yılmaz ve Wilson, 2013). Türkiye'deki eşekler hakkında literatür bilgisi oldukça azdır ve eşek ırklarının orijini hala belirsizliğini korumaktadır. Türkiye'de üç farklı tipte eşiğin bulunduğu ifade edilmektedir. Bunlardan birincisi, Türkiye'nin her bölgesinde yetiştirilen gri veya siyah renkte olan Anadolu tipidir. Diğerler ise, Amasya çevrelerinde yetiştirilen Merzifon tipi ile hakkında çok az bilgi olan Karakaçan tipidir (Yılmaz ve Wilson, 2013; Kul ve ark., 2016; Yalçın, 2016).

Günümüzdeki teknolojik gelişmeler ile birlikte yüksek verimli ve düşük maliyetli Yeni Nesil Dizileme (NGS) metotları geliştirilmeye başlanmıştır. Bu sayede tüm genom ve küçük veya büyük ölçekli DNA veya RNA yapılarının dizilenmesi oldukça kolay hale gelmiştir (Zhang ve ark., 2011). Bu metotlarla üretilen veriler, evrimsel biyoloji ve moleküler ekoloji alanlarında karşılaştırmalı analizler için kullanılmaya başlanmıştır (Meimberg ve ark., 2016). Yeni nesil dizileme metotları, mitokondriyal genomların (mitogenom) hızlı karakterizasyonu için oldukça uygundur. Mitogenom verileri, karşılaştırmalı ve evrimsel genomik, moleküler evrim, fosil veya arkeolojik örneklerin DNA analizi, tür tanımlama, genetik çeşitlilik, popülasyon genetiği, filogeni ve filocoğrafya gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Yang ve ark., 2013). Komple mitogenomdan elde edilen veriler, memeli familyaları içerisindeki [örneğin, Equidae (Jonsson ve ark., 2014; Sun ve ark., 2016), Bovidae ve Cervidae (Wada ve ark., 2010), Elephantidae (Rohland ve ark., 2007), Ursidae (Krause ve ark., 2008)] evrimsel ilişkilerin daha iyi anlaşılmasına olanak tanımıştır.

Bu çalışmada Türkiye Anadolu eşeğinin, yeni nesil dizileme platformları kullanılarak ilk mitogenom karakterizasyonu ve referans verisinin oluşturulması, kökenine ve filogenisine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Örnek eldesi ve genomik DNA izolasyonu

Bu çalışmada; 2012 yılında Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi Kars ili sınırları içerisinde ölü olarak bulunan yaklaşık üç yaşındaki kahve renkli bir dişi eşeğe ait kas dokusu, absolut etil alkolle alınmış ve -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Kas dokusundan genomik DNA (gDNA) eldesi, "QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit" ile üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA miktarı, Qubit® 2.0 Florometre platformu ve "Qubit™ dsDNA BR Kit" kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen gDNA karışımının 10 µL'si, % 1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek etidyum bromür ile boyanıp, ultraviyole ışık (UV) altında görüntülenerek kalitesi kontrol edilmiştir.

### 2.2. Komple mitogenomun Long-Range PCR amplifikasyonu

Elde edilen gDNA'dan mitogenom, Long-Range PCR yöntemi ve "NEB LongAmp® Taq 2X Master Mix (M0287S, NEB)" ürünü ile çakışan iki parça halinde çoğaltılmıştır. Mitogenom, "Geneious Prime® v2019.1.3" paket programı ile dizayn edilen iki spesifik primer çifti (CrocAL1\_2024L–CrocBH1\_13002H ve LuLu\_12690L–LuLu\_2503H) kullanılarak ~11.000 baz çifti ve ~6.500 baz çifti uzunluğunda çoğaltılmıştır (Tablo 1). Hedef bölgelerin PCR ile çoğaltma işlemi 50 µL hacimde gerçekleştirilmiş olup PCR bileşenleri ve döngü şartları sırasıyla, 1X LongAmp Taq 2X Master Mix (25 µL), her bir primerden 0.5 µM (her birinden 2.5 µL), ~30 ng gDNA (1 µL) ve bir adet 94 °C'de 1 dakika ön-denatürasyon aşamasını takip eden 30 adet 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 45 saniye primer bağlanma, 65 °C'de 10 dakika uzama aşamalarını takip eden bir adet 65 °C'de 10 dakika son uzama aşamasından oluşmaktadır. Kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için PCR işlemlerine negatif kontrol dâhil edilmiştir.

Elde edilen PCR ürünlerinden 10 µL'si, % 1.0'lik agaroz jelde yürütülmüş, 4 µL'si "Qubit dsDNA BR Assay Kit" kullanılarak miktarı belirlenmiş, PCR ürünlerinin standardizasyonu yapılarak gerekli miktara ddH<sub>2</sub>O ile seyreltilip, 1 ng amplikon (5 µL hacimde) dizileme kütüphanesi için alınmıştır.

### 2.3. Kütüphane oluşturulması, dizilenmesi ve veri analizi

Dizileme kütüphanesi, Nextera XT DNA kütüphane hazırlama kit (FC-131-1096, Illumina, San Diego, ABD) ve Nextera XT DNA kütüphane hazırlama indeks kit v2 Set A (FC-131-2001, Illumina, San Diego, ABD) ile üretici firmanın ilgili protokolleri takip edilerek oluşturulmuştur. Kütüphane oluşturulurken boncuk tabanlı normalizasyon ile her bir kütüphanenin miktarı standardize edilmiş ve "Qubit dsDNA HS Kit" kullanılarak yükleme konsantrasyonu ve miktarı belirlenmiştir. Oluşturulan kütüphanenin dizilenmesi MiSeq kartuş kit v2 (300 döngü) (MS-102-2002, Illumina, San Diego, ABD) ve MiSeq platformu (Genom ve Kök Hücre Merkezi, GENKÖK, Erciyes Üniversitesi) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm ham diziler (ortalama 130 bç uzunluğunda 179.097 okuma) Geneious Prime® v2019.1.3 paket programına transfer edilerek birleştirilmiş ve ilgili diğer analizler gerçekleştirilmiştir. Ham okumalardan adaptörlerin, uçlardaki düşük kaliteli bazların (kalite skoru (Q-skor) 30'dan küçük) ve kısa okumaların (50 bç'den küçük) çıkarılmasını içeren trimleme ve kalite filtreleme işlemleri Geneious Prime paket programında yer alan BBDuk trimleme aracıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 175.184 temiz ve kaliteli okuma "Geneious mapper" algoritması kullanılarak (Sensitivity: Highest sensitivity/Medium, Fine Tuning: Iterate up to 25 times parametreleriyle) *E. asinus*'un (NC\_001788) referans mitogenomuna göre birleştirilerek kontig dizi elde edilmiş ve gen anotasyonu yapılmıştır. Ayrıca MITOS2 (Bernt ve ark., 2013) kullanılarak genler ve sınırları belirlenmiş ve manuel olarak kontrol edilmiştir. D-loop bölgesindeki ardışık tekrarlayan dizi bölgeleri Tandem Repeats Finder Server'ı (Benson, 1999) kullanılarak tanımlanmıştır. Skew analizi, Eşitlik 1 ve 2 kullanılarak hesaplanmıştır. Eşitlikteki A, toplam adenin; T, toplam timin; G, toplam guanin;

**Tablo 1.** Komple mitogenomun çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri

| Primer adı     | Baz dizisi                     | Yön     |
|----------------|--------------------------------|---------|
| CrocAL1_2024L  | 5'-GACCGTGCAAAGGTAGCATAATC-3'  | İleri 1 |
| CrocBH1_13002H | 5'-TAATTAAGGGCTCAGGCGTTG-3'    | Geri 1  |
| LuLu_12690L    | 5'-TCGGACTAATAATTGTAACCATCG-3' | İleri 2 |
| LuLu_2503H     | 5'-CTCAGATCACGTAGGACTTAAATC-3' | Geri 2  |

C, toplam sitozin sayılarını ifade etmektedir.

$$AT \text{ skew} = [A-T]/[A+T] \quad (1)$$

$$GC \text{ skew} = [G-C]/[G+C] \quad (2)$$

## 2.4. Filogenetik analizler

Filogenetik analizler için Gen Bankası (National Center for Biotechnology Information, NCBI) veri tabanındaki mevcut *Equus* cinsi örneklerinin mitogenomları ve dış grup olarak da *Hippidion saldiasi* ve *Haringtonhippus francisci* türlerine ait veriler, MAFFT (Kato ve ark., 2002) çoklu dizi hizalama programı ile birleştirilmiştir. Veri seti için en uygun baz değişim modeli, jModeltest 2.1.10 (Darriba ve ark., 2012) programı kullanılarak AICc (düzeltilmiş Akaike Bilgi Kriteri) ve BIC (Bayesian Bilgi Kriteri) kriterlerine göre belirlenmiştir. Filogenetik ağaç oluşturmak için Neighbor-Joining (NJ), Maksimum Likelihood (ML) ve Bayesian Inference (BI) metodları kullanılmış, NJ ve ML ağaçları 10.000 tekrarlı olarak MEGA7 (Kumar ve ark., 2016) programı ile BI ağacı ise 2 milyon jenerasyonlu olarak MrBayes v3.2.6 (Ronquist ve ark., 2012) programı ile oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçlar oluştururken AICc ve BIC kriterlerine göre en uygun baz değişim modeli olarak belirlenen GTR+G+I baz değişim modeli, ML ve BI filogenetik ağaçlarının oluşturulmasında, K2P baz değişim modeli ise NJ filogenetik ağacının oluşturulmasında kullanılmıştır.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. Mitogenom yapısı, organizasyonu ve kompozisyonu

Bu çalışmada ~1.300X kapsama (min: 700, maks: 2.500) ile elde edilen Türkiye Anadolu eşeğine ait mitogenom, diğer atgil mitogenomları (Lippold ve ark., 2011; Luo, ve ark., 2011; Achilli, ve ark., 2012; Vilstrup, ve ark., 2013; Anonymous, 2014; Der Sarkissian, ve ark., 2015; Heintzman, ve ark., 2017) ile benzer yapıya sahip olup halkasal yapıda, 16.551 baz çifti (bç) uzunluğunda 13 protein kodlayan (PCGs), 22 taşıyıcı RNA (tRNA), 2 ribozomal RNA (rRNA) genlerini, 1 hafif zincir (L) replikasyon orijini (OL) ve 1 büyük kodlama yapmayan kontrol bölgesini (D-loop) içermektedir. Bu bölgelerden ND6, OL orijin ve 8 tRNA geni (tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, tRNA<sup>Glu</sup> ve tRNA<sup>Pro</sup>) hafif zincir (L) üzerinde kodlanırken, ağır zincir (H) üzerinde 12 protein kodlayan gen (PCGs), 14 tRNA ve 2 rRNA genleri kodlanmaktadır (Şekil 1 ve Tablo 2). Nükleotid kompozisyonu, adenin (A) için % 32.32, timin (T) için % 25.78, sitozin (C) için % 28.67, guanin (G) için % 13.23 hesaplanmış olup, tipik bir memeli

mitokondriyal genomunda olduğu gibi guanin en düşük frekansa sahip, A+T (% 58.10) içeriği G+C (% 41.90) içeriğinden daha yüksektir (Tablo 3).

Elde edilen eşek mitokondriyal genomu, diğer omurgalı mitogenomlarına (Rohland ve ark., 2007; Krause ve ark., 2008; Wada ve ark., 2010) benzer olarak protein kodlayan genler ve tRNA genleri arasında çakışan bölgeler ve intergenik aralıklar bulunmaktadır. Anadolu eşeğinin mitogenomunda toplam 81 bç uzunluğunda (1 ile 43 bç aralığında değişen) 10 adet çakışan bölge ve toplam 32 bç uzunluğunda (1 ile 8 bç aralığında değişen) 14 adet intergenik aralık mevcuttur (Tablo 2).

Mitogenom üzerindeki protein kodlayan genler, tüm mitogenomun % 68.90'ını oluşturmaktadır olup, toplam 11.406 bç uzunluğunda ve sonlanma kodonları (10 adet) hariç toplam 3.791 amino asit kodlamaktadır. Toplam 10 protein kodlayan genin açık okuma çerçevesi standart ATG kodonu ile başlarken, ND2 ve ND3 genleri ATA kodonu, ND5 geni ise ATT kodonu ile başlamaktadır. Bununla birlikte 8 protein kodlayan gen TAA kodonu, CYTB geni AGA kodonu, ND1 geni ise TAG kodonu olmak üzere toplam 10 protein kodlayan gen tam sonlanma kodonu ile biterken, ND3, ND4 ve COXIII genleri T-- eksik sonlanma kodonu ile bitmektedir. Pek çok metazoanda, mitokondriyal protein kodlayan genler tamamlanmamış sonlanma kodonu içerebilmektedir (Boore, 1999). Bu eksik sonlanma kodonu post-transkripsiyonel poliadenilasyon yoluyla tam bir sonlandırma kodonu oluşturulabileceği şekliyle açıklanabilmektedir (Ojala ve ark., 1981).

Mitogenomun göreceli sinonim kodon kullanımı (Relative Synonymous Codon Usage, RSCU) ve kodon kullanım analizleri, Şekil 2'de verilmiştir. Buna göre üç amino asit, lösin (615 adet, % 16.2), izolösin (350 adet, % 9.2) ve treonin (307 adet, % 8.1), en yüksek frekansa sahipken, aspartik asit (66 adet, % 1.7), arginin (64 adet, % 1.7) ve sistein (22 adet, % 0.6) en düşük frekansa sahiptir. En sık kullanılan kodonlar, CTA (287 adet, % 7.6), ATC (233 adet, % 6.1), ATA (185 adet, % 4.9) iken ATT, AGA, TAG (her biri 1 kez) nadir kullanılmış, AGG kodonu hiç kullanılmamıştır.

Taşıyıcı RNA'lar (tRNA), 60-75 bç uzunluğunda olup dihidrouridin (DHU) kolu (Şekil 3) bulunmayan tRNA<sup>Ser(AGY)</sup> hariç, diğerlerinin ikincil yapıları tipik yonca yaprağı yapısı şeklindedir. tRNA<sup>Ser(AGY)</sup>'deki eksik yonca yaprağı yapısı, diğer kollar arasındaki yapısal telafi mekanizması ile işlevsel olabilmektedir (Steinberg ve Cedergren, 1994). İki ribozomal RNA geni, 975 bç (12S rRNA) ve 1.580 bç (16S rRNA)



**Tablo 2.** Türkiye Anadolu eşeğinin mitogenom organizasyonu ve gen anotasyonları

| Gen / Bölge          | Yön | Lokasyon      | İntergenik bölge* | Büyüklik (bp) | Başlama kodonu | Sonlanma kodonu** | Antikodon |
|----------------------|-----|---------------|-------------------|---------------|----------------|-------------------|-----------|
| tRNA <sup>Phe</sup>  | H   | 1-71          | 0                 | 71            |                |                   | GAA       |
| 12S(s)-rRNA          | H   | 72-1.046      | -1                | 975           |                |                   |           |
| tRNA <sup>Val</sup>  | H   | 1.046-1.112   | 0                 | 67            |                |                   | TAC       |
| 16S(l)-rRNA          | H   | 1.113-2.692   | 0                 | 1.580         |                |                   |           |
| tRNA <sup>Leu</sup>  | H   | 2.693-2.767   | +2                | 75            |                |                   | TAA       |
| ND1                  | H   | 2.770-3.726   | -1                | 957           | ATG            | TAA               |           |
| tRNA <sup>Ile</sup>  | H   | 3.726-3.794   | -3                | 69            |                |                   | GAT       |
| tRNA <sup>Gln</sup>  | L   | 3.792-3.864   | +2                | 73            |                |                   | TTG       |
| tRNA <sup>Met</sup>  | H   | 3.867-3.935   | 0                 | 69            |                |                   | CAT       |
| ND2                  | H   | 3.936-4.976   | -2                | 1.041         | ATA            | TAG               |           |
| tRNA <sup>Trp</sup>  | H   | 4.975-5.043   | +5                | 69            |                |                   | TCA       |
| tRNA <sup>Ala</sup>  | L   | 5.049-5.117   | +1                | 69            |                |                   | TGC       |
| tRNA <sup>Asn</sup>  | L   | 5.119-5.191   | 0                 | 73            |                |                   | GTT       |
| O <sub>L</sub>       | L   | 5.192-5.226   | -3                | 35            |                |                   |           |
| tRNA <sup>Cys</sup>  | L   | 5.224-5.289   | 0                 | 66            |                |                   | GCA       |
| tRNA <sup>Tyr</sup>  | H   | 5.290-5.356   | 1                 | 67            |                |                   | GTA       |
| COXI                 | H   | 5.358-6.902   | -3                | 1.545         | ATG            | TAA               |           |
| tRNA <sup>Ser2</sup> | L   | 6.900-6.968   | +8                | 69            |                |                   | TGA       |
| tRNA <sup>Asp</sup>  | H   | 6.977-7.043   | +1                | 67            |                |                   | GTC       |
| COXII                | H   | 7.045-7.728   | +3                | 684           | ATG            | TAA               |           |
| tRNA <sup>Lys</sup>  | H   | 7.732-7.800   | +1                | 69            |                |                   | TTT       |
| ATP8                 | H   | 7.802-8.005   | -43               | 204           | ATG            | TAA               |           |
| ATP6                 | H   | 7.963-8.643   | -1                | 681           | ATG            | TAA               |           |
| COXIII               | H   | 8.643-9.426   | 0                 | 784           | ATG            | T--               |           |
| tRNA <sup>Gly</sup>  | H   | 9.427-9.496   | 0                 | 70            |                |                   | TCC       |
| ND3                  | H   | 9.497-9.842   | +1                | 346           | ATA            | T--               |           |
| tRNA <sup>Arg</sup>  | H   | 9.844-9.912   | +1                | 69            |                | -                 | TCG       |
| ND4L                 | H   | 9.914-10.210  | -7                | 297           | ATG            | TAA               |           |
| ND4                  | H   | 10.204-11.581 | 0                 | 1.378         | ATG            | T--               |           |
| tRNA <sup>His</sup>  | H   | 11.582-11.650 | 0                 | 69            |                |                   | GTG       |
| tRNA <sup>Ser</sup>  | H   | 11.651-11.710 | +1                | 60            |                |                   | GCT       |
| tRNA <sup>Leu</sup>  | H   | 11.712-11.781 | 0                 | 70            |                |                   | TAG       |
| ND5                  | H   | 11.782-13.602 | -17               | 1.821         | ATT            | TAA               |           |
| ND6                  | L   | 13.586-14.113 | 0                 | 528           | ATG            | TAA               |           |
| tRNA <sup>Glu</sup>  | L   | 14.114-14.182 | +4                | 69            |                |                   | TTC       |
| CYTB                 | H   | 14.187-15.326 | 0                 | 1.140         | ATG            | AGA               |           |
| tRNA <sup>Thr</sup>  | L   | 15.327-15.398 | +1                | 72            |                |                   | TGT       |
| tRNA <sup>Pro</sup>  | L   | 15.400-15.465 | 0                 | 66            |                |                   | TGG       |
| D-loop               | H   | 15.466-16.551 | 0                 | 1.086         |                |                   |           |

H: Ağır (H) zinciri, L: Hafif (L) zinciri, bp: Baz çiftini temsil etmektedir, \*: Negatif değerler çıkışan bölgeleri, pozitif değerler intergenik boşlukları ifade etmektedir, \*\*: Sütündeki - işaretler eksik sonlanma kodonlarını temsil etmektedir.

**Tablo 3.** Türkiye Anadolu eşeğinin mitogenomuna ait nükleotid kompozisyonları

| Bölge            | Boyut (bp) | %     | % A   | % T   | % G   | % C   | % A+T | % G+C | AT-Skew* | GC-Skew* |
|------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|
| Komple mitogenom | 16.551     | 100.0 | 32.32 | 25.78 | 13.23 | 28.67 | 58.10 | 41.90 | 0.12     | -0.37    |
| PCGs             | 11.406     | 68.90 | 31.26 | 26.30 | 12.07 | 30.36 | 57.57 | 42.43 | 0.09     | -0.43    |
| rRNAs            | 2.555      | 15.40 | 36.52 | 23.64 | 16.95 | 22.90 | 60.16 | 39.84 | 0.21     | -0.15    |
| tRNAs            | 1.518      | 9.20  | 34.52 | 27.14 | 15.61 | 22.73 | 61.66 | 38.34 | 0.12     | -0.19    |
| D-loop           | 1.086      | 5.60  | 30.68 | 23.81 | 13.17 | 32.55 | 52.40 | 47.60 | 0.17     | -0.46    |

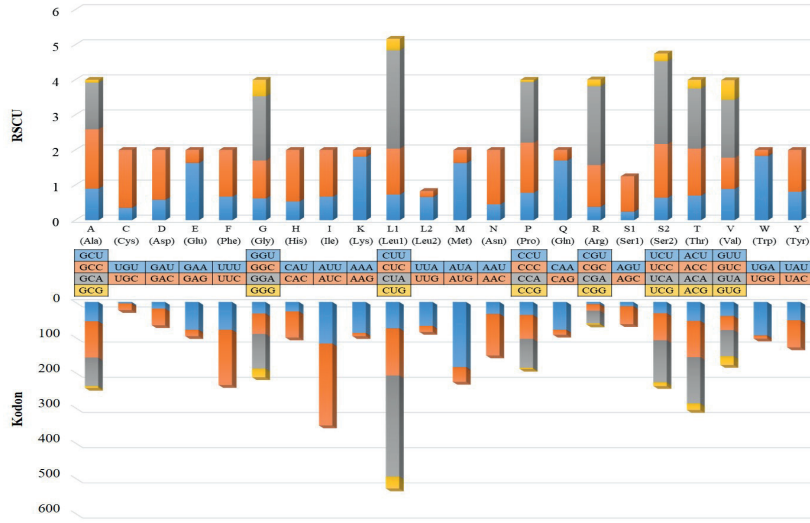
A: Adenin, T: Timin, G: Guanin, C: Sitozin nükleotidlerini temsil etmektedir. \*: AT-skew= (A-T)/(A+T) ve GC-skew= (G-C)/(G+C) formülüyle hesaplanmıştır.

olduğunu ve 13 PCG, 22 tRNA, 2 rRNA genleri ve O<sub>L</sub> ve D-loop bölgelerini içerdiğini belirtmiştir. Ayrıca bu araştırmacılar, D-loop bölgesinde CACACCCA ve TGCGCGCA tekrar motiflerini karakterize etmişlerdir. Goto ve ark. (2011), Somali yabani eşeğinin (*E. africanus*

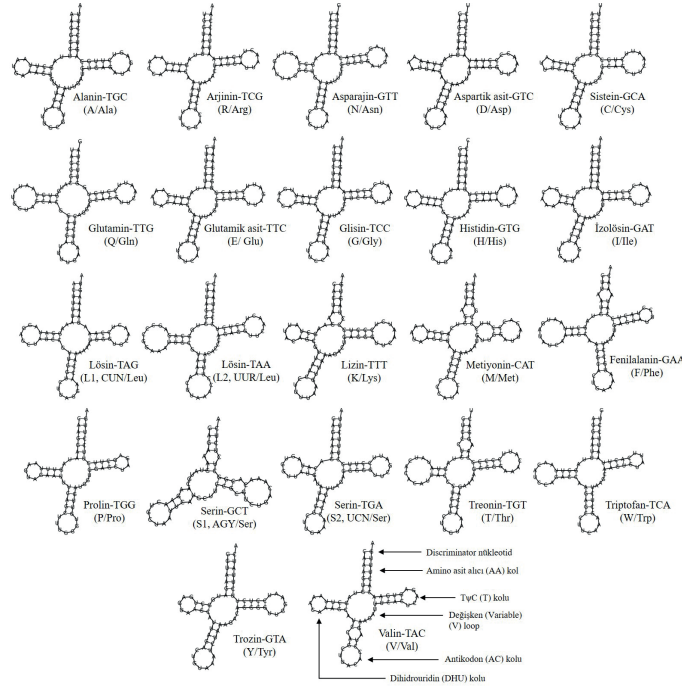
*somaliensis/E. asinus somalicus*, AP012271), Jónsson ve ark. (2014) Somali yabani eşeğinin (KM881681), Sun ve ark. (2016) Çin evcil eşek ırklarından Dezhou ve Yunnan ırklarının (KT182635), Guo ve ark. (2017) Çin evcil Qingyang ırkının (KX683425), Schubert ve ark.

(2017) Avrupa evcil eşeğin (KX669267), Hou ve ark. (2018) Somali yabani eşeğinin (MG885769), Pengjia, ve ark. (2019) Çin Liangzhou eşeğinin (MG931481) mitokondriyal genomlarını karakterize etmişlerdir. Mevcut mitogenomlardan bazıları (KT182635, KX669267, KM881681, AP012271), özellikle D-loop bölgesindeki tekrar bölgelerinde olmak üzere eksik diziler (...NNN... gibi) içermektedir. Mevcut verilerden üçü Somali yabani eşeklerine (AP012271, KM881681, MG885769), diğer üçü Çin evcil eşeklerine aitken (KT182635, KX683425, MG931481) ve geriye

kalan ikisi (X97337/NC\_001788, KX669267) lokasyonu ile ırkı belirtilmemiş Avrupa evcil eşeklere aittir. Somali yabani eşeklerinden ikisi ise (KM881681 ve MG885769) eksik diziler hariç aynıdır. Gerçekleştirilen bu çalışmada Türkiye Anadolu eşeğinin ilk kez komple mitokondriyal genomu, yeni nesil dizileme platformu ile elde edilmiş ve MK982180 erişim numarasıyla Gen Bankası (NCBI) biyolojik veri tabanına kaydedilmiştir. Elde edilen veriler, daha önceki hem eşek hem de diğer atgil mitogenom verileri ile uyumludur.



Şekil 2. Türkiye Anadolu eşeği mitogenomunda RSCU (Relative Synonymous Codon Usage) (üstte) ve kodon kullanım oranlarını (altta) gösteren grafik. İlgili oranlar y-ekseni, kodon aileleri x-ekseni üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 3. Türkiye Anadolu eşeği mitogenomunda belirlenen 22 tRNA geninin varsayılan ikincil yapıları

**Tablo 4.** Filogenetik analizlerde kullanılan *Equus* cinsi üyelerine ait mitogenom listesi

| Tür                     | Erişim no | Kaynak                        |
|-------------------------|-----------|-------------------------------|
| <i>E. asinus</i>        | KT182635  | Sun ve ark. (2016)            |
| <i>E. asinus</i>        | KX683425  | Guo ve ark. (2017)            |
| <i>E. asinus</i>        | MG931481  | Pengjia ve ark. (2019)        |
| <i>E. asinus</i>        | X97337    | Xu ve ark. (1996)             |
| <i>E. a. africanus</i>  | KX669267  | Schubert ve ark. (2017)       |
| <i>E. a. somalicus</i>  | KM881681  | Jónsson ve ark. (2014)        |
| <i>E. a. somalicus</i>  | MG885769  | Hou ve ark. (2018)            |
| <i>E. b. chapmani</i>   | JX312721  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. b. quagg</i>      | JX312733  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. grevyi</i>        | JX312725  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. grevyi</i>        | JX312722  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. grevyi</i>        | JX312723  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. hemionus</i>      | HM118851  | Luo ve ark. (2011)            |
| <i>E. h. onager</i>     | JX312730  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. h. kulan</i>      | JX312728  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. kiang</i>         | JX312732  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. kiang</i>         | JX312731  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. ovodovi</i>       | KY114520  | Druzhkova ve ark. (2017)      |
| <i>E. zebra</i>         | JX312718  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. z. hartmannae</i> | JX312719  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. zebra</i>         | JX312717  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. zebra</i>         | JX312724  | Vilstrup ve ark. (2013)       |
| <i>E. caballus</i>      | JN398377  | Achilli ve ark. (2012)        |
| <i>E. caballus</i>      | JN398392  | Achilli ve ark. (2012)        |
| <i>E. caballus</i>      | JN398408  | Achilli ve ark. (2012)        |
| <i>E. przewalskii</i>   | JN398402  | Achilli ve ark. (2012)        |
| <i>E. przewalskii</i>   | HQ439484  | Lippold ve ark. (2011)        |
| <i>E. przewalskii</i>   | AP013094  | Anonymous (2014)              |
| <i>E. caballus</i>      | JN398424  | Achilli ve ark. (2012)        |
| <i>E. caballus</i>      | JN398436  | Achilli ve ark. (2012)        |
| <i>E. caballus</i>      | JN398449  | Achilli ve ark. (2012)        |
| <i>E. caballus</i>      | JN398457  | Achilli ve ark. (2012)        |
| <i>H. francisci</i>     | KT168321  | Heintzman ve ark. (2017)      |
| <i>H. francisci</i>     | KT168328  | Heintzman ve ark. (2017)      |
| <i>H. saldiasi</i>      | KM881671  | Der Sarkissian ve ark. (2015) |
| <i>H. saldiasi</i>      | KM881672  | Der Sarkissian ve ark. (2015) |

### 3.2. Genetik çeşitlilik ve filogenetik analizler

Bu çalışmada elde edilen Türkiye Anadolu eşeğine ait mitogenom verisi ile Gen Bankası'nda mevcut olan *Equus* cinsi türlerine ait mitogenomlar (Tablo 4) birleştirilerek birlikte analiz edilmiştir. D-loop bölgesindeki farklılığın türler arasında fazla olması, büyük boşlukların bulunması, bazı mitogenomlarda özellikle ardışık dizi tekrarları bölgelerinde eksik dizilerin bulunması nedeniyle analizlere D-loop bölgesinin korunmuş yaklaşık ilk 650 bç'lik kısım dahil edilmiştir. Oluşturulan veri setinde *E. asinus* (7), *E. burchellii* (2), *E. grevyi* (3), *E. hemionus* (3), *E. kiang* (2), *E. ovodovi* (1), *E. zebra* (4), *E. caballus* (10), türlerine ait veriler bulunmaktadır. *E. asinus* türü içerisindeki genetik uzaklık değerlerinin % 0.05 ile % 1.72 arasında değiştiği ve ortalama % 0.86 olduğu tespit edilmiştir. Tür içerisindeki en küçük genetik uzaklık değeri, Çin örnekleri (Dezhou ırkı, KT182635 ve Qingyang ırkı, KX683425) arasında olup en büyük genetik uzaklık değeri ise Çin Liangzhou eşeği (MG931481) ile Somali yabani eşeği (KM881681/MG885769) arasında gözlenmiştir.

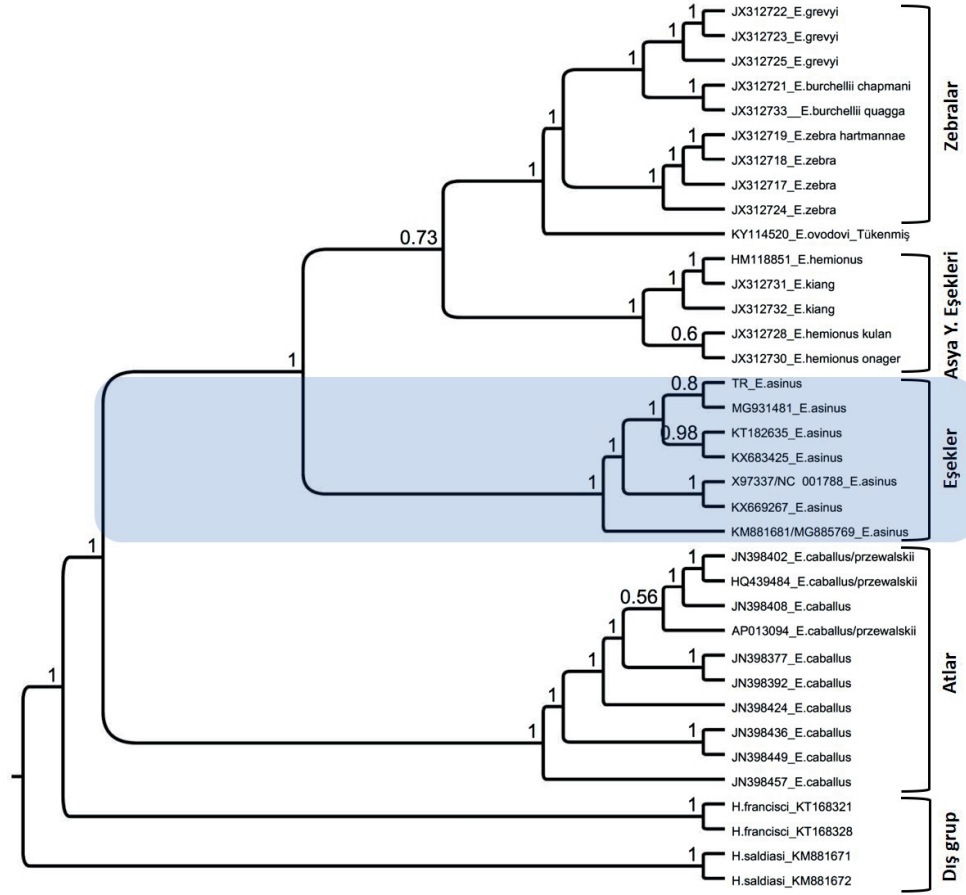
Türkiye örneğinin Çin evcil eşeklerinden genetik uzaklığı, yaklaşık % 0.1 (Dezhou ırkı, KT182635, Qingyang ırkı, KX683425, Liangzhou ırkı, MG931481) ve diğer evcil eşeklerden % 0.9 (X97337/NC\_001788 ve KX669267) iken Somali yabani eşeklerinden yaklaşık olarak % 1.7 farklı olup genetik olarak Çin eşek ırklarına oldukça yakındır. *Equus* cinsi içerisindeki türler arasında en küçük genetik uzaklık değerleri, ortalama % 1.2 ile *E. hemionus* (Kulan / Asya yaban eşeği) ve *E. kiang* (Kiang / Tibet yaban eşeği) arasındayken, en büyük genetik uzaklık değeri ise yaklaşık % 7.6 ile *E. caballus* ile *E. zebra* arasında gözlenmiştir. *Equus* cinsi içerisindeki ortalama genetik uzaklık değeri % 5.3 olarak hesaplanmıştır. Eşekler (*E. asinus*) genetik olarak yaklaşık % 5.5 ile *E. hemionus*, *E. kiang* ve *E. ovodovi*'den % 6 ile *E. burchellii*, *E. grevyi*'den, % 6.2 ile *E. zebra*'dan ve % 7.3 ile *E. caballus*'dan farklılığa sahiptir.

Üretilen üç filogenetik ağaç (ML, NJ ve BI), yüksek bootstrap ve olasılık değerleri ile benzer topolojiye sahip olup bu çalışmada sadece Bayesian ağacı verilmiştir (Şekil 4). Ağaç topolojileri incelendiğinde *Equus* cinsi, günümüz üyeleri dört büyük gruba ayrılmaktadır. Bunlardan birinci grup atları (*E. caballus/przewalskii*), ikinci grup Asya, Avrupa evcil eşekleri ve Somali yabani eşeklerini (*E. asinus/africanus* (eşek), üçüncü grup Asya'daki yabani eşekleri (*E. hemionus*, *E. kiang*), dördüncü grup ise zebraları (*E. zebra*, *E. grevyi*, *E. burchellii*, *E. quagga*) içermektedir. Günümüzde nesli tükenmiş olan *E. ovodovi*, Druzhkova ve ark. (2017)'nin bulgularına benzer olarak zebralara yakın bir ilişkide olarak ayrı bir grup oluşturmuştur. Türkiye Anadolu eşeği, filogenetik ağaçlarda ikinci grup içerisinde Çin evcil eşekleriyle birlikte kümelenmiş olup gruba Somali yabani eşeği, bazaldan bağlanmıştır. Asya yaban eşekleri ise ayrı bir küme oluşturmuştur. Bu bağlamda Türkiye Anadolu eşeği, Avrupa evcil eşeklerine oranla Çin evcil eşeklerine genetik olarak daha yakındır. Bu durum diğer çalışmalar (Sun ve ark., 2016; Guo ve ark., 2017; Pengjia, ve ark., 2019) ile uyumlu olup Türkiye Anadolu eşeğinin de diğer evcil eşekler gibi Somali yabani eşeği veya diğer Afrika yabani eşeklerinden köken alarak evcilleştirildiği görüşünü de desteklemektedir.

### 4. Sonuçlar

Bu çalışmada; Türkiye Anadolu eşeğinin 16.551 baz çiftlik mitokondriyal genomu ilk defa elde edilmiş olup, mevcut eşek ve diğer atgil mitogenomları ile karşılaştırıldığında yapı, organizasyon ve kompozisyon bakımından oldukça benzer olmakla birlikte yeni bir mitogenom haplotipi tespit edilmiştir. Genetik





**Şekil 4.** *Equus* cinsine ait mitogenom sekanları arasındaki moleküler filogenetik ilişkiyi gösteren, GTR+G+I baz değişim modeli kullanılarak elde edilen Bayesian Inference (BI) ağacı

Ağaç üzerindeki değerler olasılık ihtimallerini göstermektedir.

çeşitlilik ve filogenetik analizleri, Türkiye Anadolu eşeğinin, Çin evcil eşeklerine oldukça benzer ve yakın olduğunu önermiştir. Ayrıca bu çalışmanın sonuçları evcil eşeklerin Afrika yabani eşeklerinden (Somali yabani eşeği ve/veya Afrika yabani eşeği) evcilleştirildiği görüşünü desteklemektedir. Bu çalışmada elde edilen Türkiye Anadolu eşeğinin komple mitokondriyal genomu, Türkiye'deki eşek ırklarının belirlenmesi, korunması, eşeğin evcilleştirilmesi ile ilgili evrimsel çalışmalar için önemli temel moleküler veri sunmaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalarda, Türkiye'deki eşek ırklarının birbiriyle ve Dünya'daki diğer eşek ırklarıyla olan genetik ilişkilerinin daha iyi ortaya çıkarılması için tüm eşek ırklarını kapsayacak geniş bir örneklem yapılması ve mitogenom verilerine ilave olarak nükleer genlerle birlikte analiz edilmesi faydalı olacaktır.

### Kaynaklar

Achilli, A., Olivieri, A., Soares, P., Lancioni, H., Kashani, B.H., Perego, U.A., Felicetti, M., 2012.

Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7): 2449-2454.

Anonymous, 2014. *Equus przewalskii* Mitochondrial DNA, Complete Genome, Isolate: NOUMA1, GenBank: AP013094.1. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP013094>), (Erişim tarihi: 15.04.2019).

Anonymous, 2019. Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS). (<http://www.fao.org/dad-is/en/>), (Erişim tarihi: 05.05.2019).

Beja-Pereira, A., England, P.R., Ferrand, N., Jordan, S., Bakhiet, A.O., Abdalla, M.A., Mashkour, M., Jordana, J., Taberlet, P., Luikart, G., 2004. African origins of the domestic donkey. *Science*, 304(5678): 1781.

Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(2): 573-580.

Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritsch, G., Pütz, J., Middendorf, M., Stadler, P.F., 2013. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation.

- Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(2): 313-319.
- Bertolini, F., Scimone, C., Geraci, C., Schiavo, G., Utzeri, V.J., Chiofalo, V., Fontanesi, L., 2015. Next generation semiconductor based sequencing of the donkey (*Equus asinus*) genome provided comparative sequence data against the horse genome and a few millions of single nucleotide polymorphisms. *PLoS one*, 10(7): e0131925.
- Boore, J.L., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767-1780.
- Clutton-Brock, J., 1992., *Horse Power: A History of the Horse and the Donkey in Human Societies*. Harvard University Press, Cambridge, USA.
- Cozzi, M.C., Valiati, P., Cherchi, R., Gorla, E., Prinsen, R.T.M.M., Longeri, M., Bagnato, A., Strillacci, M.G., 2018. Mitochondrial DNA genetic diversity in six Italian donkey breeds (*Equus asinus*). *Mitochondrial DNA Part A*, 29(3): 409-418.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.
- Der Sarkissian, C., Vilstrup, J. T., Schubert, M., Seguin-Orlando, A., Eme, D., Weinstock, J., Prieto, A., 2015. Mitochondrial genomes reveal the extinct *Hippidion* as an outgroup to all living equids. *Biology letters*, 11(3): 20141058.
- Druzhkova, A.S., Makunin, A.I., Vorobieva, N.V., Vasiliev, S.K., Ovodov, N.D., Shunkov, M.V., Trifonov, V.A., Graphodatsky, A.S., 2017. Complete mitochondrial genome of an extinct *Equus (Sussemionus) ovodovi* specimen from Denisova cave (Altai, Russia). *Mitochondrial DNA Part B*, 2(1): 79-81.
- Goto, H., Ryder, O.A., Fisher, A.R., Schultz, B., Kosakovsky Pond, S.L., Nekrutenko, A., Makova, K.D., 2011. A massively parallel sequencing approach uncovers ancient origins and high genetic variability of endangered Przewalski's horses. *Genome Biology and Evolution*, 3: 1096-1106.
- Guo, X., Bao, P., Pei, J., Ding, X., Liang, C., Yan, P., Lu, D., 2017. Complete mitochondrial genome of Qingyang donkey (*Equus asinus*). *Conservation Genetics Resources*, 9(2): 269-271.
- Heintzman, P.D., Zazula, G.D., MacPhee, R.D., Scott, E., Cahill, J.A., McHorse, B.K., Kapp, J.D., Stiller, M., Wooller, M.J., Orlando, L., Southon, J., 2017. A new genus of horse from Pleistocene North America. *Elife*, 6: e29944.
- Hou, H.Y., Chang, R.X., Cheng, Y.N., Jang-Liaw, N.H., 2018. Complete mitochondrial genome sequence for the somali wild ass *Equus africanus somaliensis*. *Conservation Genetics Resources*, 1-5.
- Huggins, B., 2002. "*Equus asinus*" (On-line), animal diversity web. ([https://animaldiversity.org/accounts/Equus\\_asinus/](https://animaldiversity.org/accounts/Equus_asinus/)), (Erişim tarihi: 10.05.2019).
- Jónsson, H., Schubert, M., Seguin-Orlando, A., Ginolhac, A., Petersen, L., Fumagalli, M., Lear, T., 2014. Speciation with gene flow in equids despite extensive chromosomal plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(52): 18655-18660.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14): 3059-3066.
- Krause, J., Unger, T., Noçon, A., Malaspinas, A.S., Kolokotronis, S.O., Stiller, M., Soibelzon, L., Spriggs, H., Dear, P.H., Briggs, A.W., Bray, S.C., O'Brien, S.J., Rabeder, G., Matheus, P., Cooper, A., Slatkin, M., Pääbo, S., Hofreiter, M., 2008. Mitochondrial genomes reveal an explosive radiation of extinct and extant bears near the Miocene-Pliocene boundary. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 1-12.
- Kul, B.C., Bilgen, N., Akyuz, B., Ertugrul, O., 2016. Molecular phylogeny of Anatolian and Cypriot donkey populations based on mitochondrial DNA and Y-chromosomal STRs. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63(2): 143-149.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870-1874.
- Lippold, S., Matzke, N.J., Reissmann, M., Hofreiter, M., 2011. Whole mitochondrial genome sequencing of domestic horses reveals incorporation of extensive wild horse diversity during domestication. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 1-10.
- Luo, Y., Chen, Y., Liu, F., Jiang, C., Gao, Y., 2011. Mitochondrial genome sequence of the Tibetan wild ass (*Equus kiang*). *Mitochondrial DNA*, 22(1-2): 6-8.
- Meimberg, H., Schachtler, C., Curto, M., Husemann, M., Habel, J.C., 2016. A new amplicon based approach of whole mitogenome sequencing for phylogenetic and phylogeographic analysis: An example of East African white-eyes (Aves, Zosteropidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102: 74-85.
- Ojala, D., Montoya, J., Attardi, G., 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290: 470-474.
- Pengjia, B., Guo, X., Pei, J., Ding, X., Wu, X., Xiong, L., Liang, C., Chu, M., Yan, P., 2019. Characterization of the complete mitochondrial genome of the Liangzhou donkey (*Equus asinus*). *Mitochondrial DNA Part B*, 4(1): 1846-1847.
- Rohland, N., Malaspinas, A.S., Pollack, J.L., Slatkin, M., Matheus, P., Hofreiter, M., 2007. Proboscidean mitogenomics: Chronology and mode of elephant evolution using mastodon as outgroup. *PLoS Biology*, 5(8): e207.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P.V.D., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539-542.
- Rosenbom, S., Costa, V., Al-Araimi, N., Kefena, E., Abdel-Moneim, A.S., Abdalla, M.A., Bakhiet, A., Beja-Pereira, A., 2015. Genetic diversity of donkey

- populations from the putative centers of domestication. *Animal Genetics*, 46(1): 30-36.
- Saccone, C., Pesole, G., Sbisà, E., 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution*, 33(1): 83-91.
- Schubert, M., Mashkour, M., Gaunitz, C., Fages, A., Seguin-Orlando, A., Sheikhi, S., Alfarhan, A.H., Alquraishi, S.A., Al-Rasheid, K.A.S., Chuang, R., Ermini, L., Gamba, C., Weinstock, J., Vedat, O., Orlando, L., 2017. Zonkey: A simple, accurate and sensitive pipeline to genetically identify equine F1-hybrids in archaeological assemblages. *Journal of Archaeological Science*, 78: 147-157.
- Steinberg, S., Cedergren, R., 1994. Structural compensation in a typical mitochondrial tRNAs. *Nature Structural Biology*, 1(8): 507-510.
- Sun, Y., Jiang, Q., Yang, C., Wang, X., Tian, F., Wang, Y., Ma, Y., Ju, Z., Huang, J., Zhou, X., Zhong, J., Wang, C., 2016. Characterization of complete mitochondrial genome of Dezhou donkey (*Equus asinus*) and evolutionary analysis. *Current Genetics*, 62(2): 383-390.
- Vilstrup, J.T., Seguin-Orlando, A., Stiller, M., Ginolhac, A., Raghavan, M., Nielsen, S.C., Weinstock, J., Froese, D., Vasiliev, S.K., Ovodov, N.D., Clary, J., Helgen, K.M., Fleischer, R.C., Cooper, A., Shapiro, B., Orlando, L., 2013. Mitochondrial phylogenomics of modern and ancient equids. *PLoS One*, 8(2): e55950.
- Wada, K., Okumura, K., Nishibori, M., Kikkawa, Y., Yokohama, M., 2010. The complete mitochondrial genome of the domestic red deer (*Cervus elaphus*) of New Zealand and its phylogenetic position within the family Cervidae. *Animal Science Journal*, 81(5): 551-557.
- Wilson, D.E., Reeder, D.M., 2005. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference (3. Edition). Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Xu, X., Gullberg, A., Arnason, U., 1996. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs. *Journal of Molecular Evolution*, 43(5): 438-446.
- Yalçın, E., 2016. Kırklareli ili eşek çiftliğindeki populasyonun çeşitli vücut ölçülerine göre morfolojik karakterizasyonu ve mtDNA polimorfizmi yoluyla genetik çeşitliliğinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Yang, X.S., Xue, D.Y., Han, H.X., 2013. The complete mitochondrial genome of *Biston panterinaria* (Lepidoptera, Geometridae), with phylogenetic utility of mitochondrial genome in the Lepidoptera. *Gene*, 515(2): 349-358.
- Yılmaz, O., Ertuğrul, M., 2011. Eşegin (*Equus asinus*) evcilleştirilmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(3): 111-115.
- Yılmaz, O., Ertuğrul, M., 2014. Türkiye’de yetiştirilen kimi tek tırnaklılara ait bazı morfolojik özellikler. *Çanakkale Onsekizmart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(2): 9-16.
- Yılmaz, O., Wilson, R.T., 2013. The domestic livestock resources of Turkey: Notes on donkeys. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(2): 651-656.
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A., Zhang, G., 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(3): 95-109.