

GIẢI TRÌNH TỰ VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HỆ GEN LỤC LẠP CÂY MÙ U (*Calophyllum inophyllum* L.) Ở TỈNH TRÀ VINH

Huỳnh Đoàn Thiện Phúc¹, Trương Thị Thanh Huyền², Trần Thị Thu Hồng³,
Đỗ Hoàng Đăng Khoa⁴, Nguyễn Nhật Nam^{5*}

SEQUENCING AND CHARACTERIZING THE CHLOROPLAST GENOME OF Calophyllum inophyllum M. L. DISTRIBUTED AT TRA VINH PROVINCE, VIETNAM

Huynh Doan Thien Phuc¹, Truong Thi Thanh Huyen², Tran Thi Thu Hong³,
Do Hoang Dang Khoa⁴, Nguyen Nhat Nam^{5*}

Tóm tắt – Với giá trị thảo dược cao, nhiều sản phẩm được phát triển từ cây mù u như dầu mù u và các loại nguyên liệu mỹ phẩm. Tại tỉnh Trà Vinh, mô hình khai thác và phát triển nguồn gen cây mù u tại xã Mỹ Long Nam, huyện Cầu Ngang đang được triển khai thực hiện và cho thấy tiềm năng phát triển kinh tế. Thông tin hệ gen thực vật, đặc biệt hệ gen lục lạp, là cơ sở phát triển các ứng dụng trong lĩnh vực nông nghiệp như lai tạo giống, các nghiên cứu di truyền, và phát triển chỉ thị phân tử. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới được thực hiện để giải mã trình tự, thành phần gen và đặc điểm cấu trúc của bộ gen lục lạp cây mù u. Kết quả cho thấy, hệ gen lục lạp cây mù u (*Calophyllum inophyllum* L.) có kích thước là 161.169 bp. Hệ gen lục lạp bao gồm 79 gen mã hóa protein, 30 vùng mã hóa tRNA và bốn vùng mã hóa rRNA. Kết quả này cung cấp thông tin cơ bản cho các nghiên cứu bảo tồn, nghiên cứu đa dạng sinh học và các ứng dụng cơ sở di truyền của cây mù u cũng như các loài liên quan.

Từ khóa: đa dạng di truyền, giải trình tự thế

hệ mới, hệ gen lục lạp.

Abstract – Due to its high content of medicinal value, many products have been developed from the tamanu tree, such as tamanu oil and various cosmetic raw materials. In Tra Vinh Province, a model for exploiting and conserving genetic resources of tamanu was conducted at My Long Nam Ward, Cau Ngang District, and showed potential for economic development. The Chloroplast genome is one of three genomes of plants that exhibit an important role in agriculture, such as breeding, genetic studies, and molecular marker development. In this study, next-generation sequencing technology was used to decode the sequence, gene composition, and structural characteristics of the chloroplast genome of the tamanu tree. Consequently, the complete chloroplast genome of the tamanu tree was 161,169 bp in length. This genome included 79 protein-coding genes, 30 tRNA genes, and four rRNA genes. The results of this study provide essential information for further studies about conservation, biodiversity, and application of genomic data of mastwood and related species.

Keywords: Chloroplast genome, genetic diversity, next-generation sequencing method.

^{1,2,3,5}Trường Đại học Trà Vinh, Việt Nam
⁴Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam
Ngày nhận bài: 02/4/2024; Ngày nhận bài chỉnh sửa: 05/5/2024; Ngày chấp nhận đăng: 07/5/2024
*Tác giả liên hệ: nnnam@tvu.edu.vn
^{1,2,3,5}Tra Vinh University, Vietnam
⁴Nguyen Tat Thanh University, Vietnam
Received date: 02nd April 2024; Revised date: 05th May 2024; Accepted date: 07th May 2024
*Corresponding author: nnnam@tvu.edu.vn

I. GIỚI THIỆU

Cây mù u (*Calophyllum inophyllum* L.), còn được gọi là hồ đồng hay công, thuộc họ Măng cụt/Bứa (Clusiaceae) [1]. Tại Việt Nam, cây mù u mọc hoang hoặc được trồng phổ biến, phân bố tập trung ở các tỉnh phía Nam, trong đó có Trà Vinh. Từ lâu, cây mù u được biết đến là một trong những cây có giá trị dược liệu rất cao. Hầu hết các bộ phận của cây đều được sử dụng để làm thuốc chữa bệnh như phần rễ, lá, nhựa mủ, hạt hoặc dầu ép từ hạt [2]. Mù u chứa nhiều hoạt chất có giá trị dược liệu cao, trong nhân hạt chứa 50,2–73% dầu, vỏ hạt chứa leucocyanidin, vỏ cây chứa 11,9% tannin, acid hữu cơ, saponin triterpene, phytosterol, tinh dầu, coumarin. Mủ của quả có các glycerid, tinh dầu, nhựa và các phức hợp lacion (dẫn xuất coumarin) như calophylloid, mophyllolid, acid calophyllic [3, 4]. Ngoài ra, một lượng lớn acid béo trong dầu mù u như stearic, palmitic, myristic, lauric, margaric, arachidic, eicosenoic, linoleic [5, 6]. Các hoạt chất trong mù u được chứng minh có tác dụng trong phòng chống ung thư, khối u, kháng viêm, kháng khuẩn, chống kết tập tiểu cầu, loạn thần, chống đông máu và giảm đau [4, 7, 8]. Có thể thấy mù u là loài thực vật có giá trị cao về kinh tế và là dược liệu quý cần có các nghiên cứu về ứng dụng và bảo tồn.

Hiện tại, ngoài các nghiên cứu ứng dụng dựa trên giá trị dược liệu cây mù u, các đề tài bảo tồn giống cây này cũng được quan tâm thực hiện [9–11]. Tuy nhiên, các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào vấn đề thu thập các đặc tính môi trường sống, định danh phân tử cây mù u dựa trên bộ sáu chỉ thị SSR (simple sequence repeats) [11]. Một nội dung quan trọng trong bảo tồn nguồn gen là cơ sở dữ liệu hệ gen bao gồm các trình tự mã hóa protein, RNA ribosome, và RNA vận chuyển của cây mù u chưa được quan tâm thực hiện. Trước đây, trình tự bộ gen lục lạp chưa hoàn chỉnh của cây mù u phân bố tại Indonesia đã được công bố [12]. Tuy nhiên, dữ liệu bộ gen lục lạp chưa hoàn chỉnh nên chưa cung cấp thông tin đầy đủ và chính xác về đặc điểm của bộ gen lục lạp của cây mù u. Bên cạnh đó, các nguy cơ về suy thoái môi trường và tác động sinh học, vi sinh học dẫn đến việc xói mòn nguồn gen thực vật là rất cao. Do đó, việc xây dựng cơ sở dữ liệu nguồn gen

tự nhiên của các giống cây có giá trị kinh tế – xã hội, y học nhằm phục vụ công tác nghiên cứu bảo tồn, phục hồi và tái tạo nguồn lợi giống cây trồng là cấp thiết, đã và đang được quan tâm thực hiện tại nhiều đơn vị nghiên cứu ở Việt Nam và trên thế giới.

II. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Một trong những nguồn gen quan trọng có thể cung cấp thông tin di truyền của thực vật là hệ gen lục lạp [13, 14]. Lục lạp và ti thể là những bào quan có bộ gen riêng biệt so với bộ gen trong nhân tế bào. Bộ gen lục lạp cung cấp thông tin nghiên cứu về mối quan hệ tiến hóa của các loài, xác định loài một cách chính xác, cung cấp chỉ thị ứng dụng trong chuyển gen, nhân giống [13]. Lục lạp được xem là trung tâm trao đổi chất của thực vật. Nó đóng vai trò thiết yếu trong sinh lý học, sự phát triển và tiến hóa của thực vật. Bộ gen plastid của thực vật bậc cao là một phân tử DNA sợi kép dạng vòng, có kích thước từ 120 đến 180 kb và chứa khoảng 130 gen, tùy thuộc vào loài thực vật, chủ yếu mã hóa các enzyme tham gia vào quá trình quang hợp [14]. Vai trò quan trọng nhất của lục lạp là thực hiện cơ chế quang hợp. Ngoài ra, nó có vai trò chính trong việc sản xuất tinh bột, lipid, protein thiết yếu, vitamin, khoáng và tổng hợp một số sắc tố tạo màu cho hoa. Nó có cấu trúc bốn phần với hai phần lặp đảo (IRa và IRb, dài 20–28 kb) được phân tách bằng hai vùng trình tự đơn lớn (LSC, dài 80–90 kb) và trình tự đơn nhỏ (SSC, 16–27 kb). Các vùng này được sử dụng làm ‘siêu mã vạch’ trong các nghiên cứu phát sinh loài, lịch sử tiến hóa vì chúng cung cấp tính đa hình dựa trên trình tự [15] và có các đặc tính di truyền độc đáo (di truyền đơn dòng, sự sắp xếp gen được bảo tồn tốt, kích thước nhỏ, đơn bội, và bản chất thường không tái tổ hợp) [16, 17]. Hệ gen lục lạp có một hệ thống di truyền độc lập với nhân, cho phép tự sao chép và phiên mã. Hệ thống di truyền lục lạp được di truyền độc lập và được bảo tồn trong suốt quá trình tiến hóa. Các gen của hệ gen lục lạp đóng vai trò quan trọng trong các tổ chức như rRNA, tRNA, RNA polymerase.

Ở Việt Nam, năm 2020, báo cáo đầu tiên về trình tự lục lạp của một loài lan hài (*Paphiopedilum delenatii* Guillaumin) được công bố [17].

Từ đó, các nghiên cứu khác nhau về bộ gen lục lạp của các loài phân bố ở Việt Nam đã được thực hiện như *Ludisia discolor*, *Adinandra megaphylla*, và *Bruguiera hainesii* [18–20]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về trình tự lục lạp của cây mù u phân bố ở tỉnh Trà Vinh, Việt Nam chưa được quan tâm thực hiện. Do đó, trong nghiên cứu này, trình tự hoàn chỉnh bộ gen lục lạp của cây mù u thu nhận tại tỉnh Trà Vinh được giải trình tự bằng công nghệ giải trình tự thế hệ mới. Bên cạnh đó, các thông tin cơ bản về cấu trúc và thành phần gen của bộ gen lục lạp cây mù u cũng được khảo sát và ghi nhận.

III. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

A. Thu thập mẫu, tách chiết ADN và giải trình tự

Mẫu lá tươi không bị sâu bệnh của cây mù u mọc tự nhiên tại vườn cây ăn trái của người dân thu thập tại tỉnh Trà Vinh (9°58'10.8"N 106°19'01.6"E, Hình 1(A)). Sau đó, mẫu lá được làm khô bằng cách để trong túi kín chứa các hạt silica hút ẩm ở nhiệt độ phòng. Mẫu lá sau đó được dùng để tách ADN tổng số bằng quy trình CTAB [20]. Mẫu ADN sau khi tách chiết sẽ được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di gel-agarose 1% và đo nồng độ bằng máy NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, USA). Các mẫu ADN có băng rõ trên gel điện di và không có vết kéo dài cùng với nồng độ ít nhất 100 ng/ μ L với các chỉ số A260/280 trong khoảng 1,8–2,0 và chỉ số A260/230 trong khoảng 2,0–2,2 được sử dụng để thực hiện quá trình giải trình tự bằng hệ thống máy Miniseq (Illumina, USA) tại Công ty KTEST (Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam) với dữ liệu trình tự hai chiều với kích thước 151 bp.

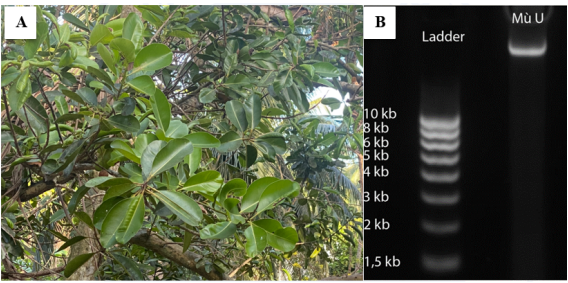
B. Lắp ráp và phân tích hệ gen lục lạp cây mù u

Dữ liệu trình tự thô từ hệ thống Illumina được kiểm tra chất lượng (Q-score > 20, không chứa kí tự N và chiều dài lớn hơn 100 bp) và loại bỏ các trình tự không đạt chất lượng bằng chương trình fastp với các thiết lập mặc định [22]. Các trình tự đạt chất lượng sau khi lọc được sử dụng để lắp ráp trình tự bộ gen lục lạp bằng chương trình NOVOPlasty theo quy trình đề xuất của

tác giả với trình tự tham chiếu là bộ gen lục lạp của *Calophyllum soulattri* (mã số GenBank OP573228) [23]. Sau đó, thành phần gen trong bộ gen lục lạp của cây mù u được chú giải bởi chương trình Geseq [24]. Các thành phần gen được kiểm tra lại bằng chương trình Geneious Prime v2023.2.

IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả điện di cho thấy mẫu ADN có băng rõ trên gel agarose, không có vết kéo dài và kích thước lớn hơn 10 kb (Hình 1(B)). Ngoài ra, kết quả đo nồng độ cho thấy mẫu ADN có nồng độ là 253 ng/ μ L và đủ tiêu chuẩn để sử dụng cho quá trình giải trình tự. Kết quả giải trình tự cho thấy tổng cộng có 3.444.342 trình tự với kích thước 151 bp được tạo ra. Quá trình kiểm tra chất lượng cho thấy các trình tự đều đạt chất lượng (Q-score > 20; không có chứa kí tự N và kích thước lớn hơn 100 bp). Do đó, các trình tự được sử dụng để lắp ráp trình tự bộ gen lục lạp của cây mù u. Kết quả lắp ráp cho thấy có một trình tự ADN hoàn chỉnh với cấu trúc tròn và kích thước 161.169 bp. Bộ gen này có bốn vùng bao gồm một trình tự đơn lớn (kích thước 84.049 bp), một trình tự đơn nhỏ (kích thước 17.430 bp) và hai trình tự lặp đảo với kích thước 27.345 bp cho mỗi vùng (Hình 2). Thành phần GC của bộ gen này là 36,4%. Trong đó, thành phần GC của trình tự đơn lớn, trình tự đơn nhỏ, và trình tự lặp đảo lần lượt là 33,9%, 30,6% và 42,2%.



Hình 1: (A) Hình ảnh cây mù u được chọn thu nhận mẫu, (B) Kết quả điện di DNA tổng số đã tinh sạch trên gel agarose, Ladder (Bioline, 1kb)

Kết quả chú giải thành phần gen cho thấy có 79 gen mã hóa protein, 30 gen mã hóa ARN vận chuyển và bốn gen mã hóa ARN ribosome

đồ di truyền mật độ cao. Tất cả các công cụ và nguồn lực này tạo điều kiện thuận lợi cho việc nghiên cứu tính đa dạng di truyền, điều này rất quan trọng đối với việc quản lý, nâng cao và sử dụng nguồn gen giống cây trồng. Những tiến bộ trong lĩnh vực gen học đang cung cấp cho các nhà tạo giống những công cụ và phương pháp mới cho phép đạt được bước tiến vượt bậc trong nhân giống cây trồng, bao gồm cả ‘siêu thuần hóa’ cây trồng cũng như phân tích di truyền và nhân giống các tính trạng phức tạp. Một nghiên cứu trước đây về bộ gen lục lạp của họ Bứa đã cho thấy một số biến đổi như đảo đoạn, mất vùng intron của gen và các mối liên hệ phát sinh xây dựng từ các vùng gen mã hóa protein của lục lạp [25]. Là một thành viên của họ Bứa, cây mù u tuy không phải là cây nông nghiệp hay công nghiệp quan trọng nhưng giá trị dược liệu mà cây mù u mang lại rất hữu ích [8]. Do đó, các ứng dụng của hệ gen lục lạp về lai tạo và chọn giống không thể áp dụng ở thời điểm hiện tại cho cây mù u. Tuy nhiên, các nghiên cứu về đa dạng di truyền, tiến hóa thích nghi và phát triển chỉ thị phân tử định danh cho cây mù u dựa trên hệ gen lục lạp có thể thực hiện được.

V. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, bộ gen lục lạp của cây mù u phân bố tại tỉnh Trà Vinh đã được giải trình tự thành công và được mô tả chi tiết về cấu trúc và thành phần gen. Các thông tin này rất cần thiết để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo về đa dạng di truyền của cây mù u phân bố ở Việt Nam. Bên cạnh đó, các nghiên cứu tiếp theo về so sánh bộ gen lục lạp sẽ cung cấp thông tin hữu ích về quá trình tiến hóa và thích nghi của cây mù u với các loài thân thuộc trong họ Bứa.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Trà Vinh thông qua Hợp đồng số 150/2023/HĐ.HĐKH&ĐT-ĐHTV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Plants of the world online. *Calophyllum inophyllum* L. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:427190-1> [Accessed 23rd March 2024].
- [2] Lưu Xuân Cường, Trần Văn Thái, Lê Xuân Tiến, Nguyễn Đức Hiệp Tâm. *Mở cánh cửa ra thế giới cho dầu mù u của Việt Nam*. <https://vjst.vn/vn/tin-tuc/5441/mo-can-h-cua-ra-the-gioi-cho-dau-mu-u-cua-viet-nam.aspx> [Ngày truy cập 23/03/2024] [Lưu Xuân Cường, Trần Văn Thái, Lê Xuân Tiến, Nguyễn Đức Hiệp Tâm. Open the door to the world for Vietnamese tamanu oil. <https://vjst.vn/vn/tin-tuc/5441/mo-can-h-cua-ra-the-gioi-cho-dau-mu-u-cua-viet-nam.aspx> [Accessed 23rd March 2024].
- [3] Vittaya L, Chalad C, Ratsameepakai W, Leesakul N. Phytochemical characterization of bioactive compounds extracted with different solvents from *Calophyllum inophyllum* flowers and activity against pathogenic bacteria. *South African Journal of Botany*. 2023;154: 346–355. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.01.052>.
- [4] Ferdosh S. The extraction of bioactive agents from *Calophyllum inophyllum* L., and their pharmacological properties. *Scientia Pharmaceutica*. 2024;92(1): 6–14. <https://doi.org/10.3390/scipharm92010006>.
- [5] Nayak SK, Mishra PC. Emission from a dual fuel operated diesel engine fuelled with *Calophyllum inophyllum* biodiesel and producer gas. *International Journal of Automotive and Mechanical Engineering*. 2017;14(1): 3954–3969.
- [6] Kusumaningtyas RD, Prasetyawan H, Anggraeni ND, Anisa EDN, Hartanto D. Conversion of free fatty acid in *Calophyllum inophyllum* oil to fatty acid ester as precursor of bio-based epoxy plasticizer via SnCl₂-catalyzed esterification. *Polymers*. 2022;15(1): 123. <https://doi.org/10.3390/polym15010123>.
- [7] Ansel JL, Lupo E, Mijouin L, Guillot S, Butaud JF, Ho R, et al. Biological activity of polynesian *Calophyllum inophyllum* oil extract on human skin cells. *Planta Medica*. 2016;82(11/12): 961–966. <https://doi.org/10.1055/s-0042-108205>.
- [8] Ruangsuriya J, Sichaem J, Tantraworasin A, Saeteng S, Wongmaneerung P, Inta A, et al. Phytochemical profiles and anticancer effects of *Calophyllum inophyllum* L. extract relating to reactive oxygen species modulation on patient-derived cells from breast and lung cancers. *Scientifica*. 2023;2023: 1–16. <https://doi.org/10.1155/2023/6613670>.
- [9] Leksono B, Windyarini E, Adinugraha HA, Artati Y, Kwon J, Baral H. Growth performance of *Calophyllum inophyllum* in bioenergy trial plots in Bukit Soeharto Forest, East Kalimantan. In: Baral H, Leksono B, Seol M (eds.) *Bioenergy for landscape restoration and livelihoods: Re-creating energy-smart ecosystems on degraded landscapes*. Bogor, Indonesia: CIFOR; 2022. p.136–151.
- [10] Fiani A. Growth of six populations of *Calophyllum inophyllum* of Java land race at five years of age at the ex situ conservation plot in Cilacap, Central Java. *Proceedings of the National Seminar on the Indonesian Biodiversity Society*. 2015;1(4): 900–903. [Fiani A. Pertumbuhan enam populasi nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) ras lahan Jawa umur lima tahun di plot konservasi ex situ Cilacap, Jawa Tengah.

- Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. 2015;1(4): p.900–903].
- [11] Nurtjahjaningsih ILG, Prihatini I, Qiptiyah M, Rim-bawanto A. Genetic structure of *Calophyllum inophyllum* L. in Dompu Natural Forest. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020;522(1): 012010. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/522/1/012010>.
 - [12] Kristianti AAE, Dwiyaniti FG, Pratama R, Siregar IZ. Characterization of the chloroplast genome sequence of *Calophyllum inophyllum*, a bioenergy tree species, using Oxford Nanopore Technologies. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2024;1315(1): 012077. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1315/1/012077>.
 - [13] Daniell H, Lin CS, Yu M, Chang WJ. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biology*. 2016;17(1): 134. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1004-2>.
 - [14] Dobrogojski J, Adamiec M, Luciński R. The chloroplast genome: a review. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2020;42(6): 98–111. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03089-x>.
 - [15] Wu L, Wu M, Cui N, Xiang L, Li Y, Li X, et al. Plant super-barcode: a case study on genome-based identification for closely related species of *Fritillaria*. *Chinese Medicine*. 2021;16(1): 52–63. <https://doi.org/10.1186/s13020-021-00460-z>.
 - [16] Park HS, Lee WK, Lee SC, Lee HO, Joh HJ, Park JY, et al. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in cucumber revealed by four reciprocal F1 hybrid combinations. *Scientific Reports*. 2021;11(1): 2506–2517. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81988-w>.
 - [17] Vu HT, Tran N, Nguyen TD, Vu QL, Bui MH, Le MT, et al. Complete chloroplast genome of *Paphiopedilum delenatii* and phylogenetic relationships among Orchidaceae. *Plants*. 2020;9(1): 61–78. <https://doi.org/10.3390/plants9010061>.
 - [18] Tran VH, Hoang TTT, Pham MP, Vu DG, Nguyen QK, Vu DD. Complete chloroplast genome of endangered *Bruguiera hainesii* C.G.Rogers 1919 and phylogenetic analysis with associated species. *Biomedical and Biotechnology Research Journal*. 2023;7(4):590–597. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_218_23.
 - [19] Nguyen HQ, Nguyen TNL, Doan TN, Nguyen TTN, Phạm MH, Le TL, et al. Complete chloroplast genome of novel *Adrinandra megaphylla* Hu species: molecular structure, comparative and phylogenetic analysis. *Scientific Reports*. 2021;11(1): 11731–11742. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91071-z>.
 - [20] Ho VT, Nguyen MP, Trinh TH. The initial complete chloroplast genome of *Ludisia discolor* in Vietnam. *Nusantara Bioscience*. 2023;15(2): 232–237. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n150209>.
 - [21] Schenk JJ, Becklund LE, Carey SJ, Fabre PP. What is the “modified” CTAB protocol? characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications in Plant Sciences*. 2023;11(3): e11517. <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>.
 - [22] Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17): i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
 - [23] Dierckxsens N, Mardulyn P, Smits G. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(4): e18–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw955>.
 - [24] Tillich M, Lehwark P, Pellizzer T, Ulbricht-Jones ES, Fischer A, Bock R, et al. GeSeq – versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Research*. 2017;45: 6–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx391>.
 - [25] Trad RJ, Cabral FN, Bittrich V, Silva SR da, Amaral M. *Calophyllaceae* plastomes, their structure and insights in relationships within the clusoids. *Scientific Reports*. 2021;11(1): 20712. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99178-z>.
 - [26] Pahayo DG, Cadorna CAE, Quimado MO, Rey JD. The complete chloroplast genome of *Calophyllum soulattri* Burm. f. (*Calophyllaceae*). *Mitochondrial DNA Part B*. 2023;8(5): 607–611. <https://doi.org/10.1080/23802359.2023.2215350>.
 - [27] Alexander ESE, Ariel TCJ, Rascón CQ, Ramona SGS. Biotechnological applications of plastid foreign gene expression. In: Ratnadewi D, Hamim (eds.) *Plant Growth and Regulation - Alterations to Sustain Unfavorable Conditions*. IntechOpen; 2018. p.85–103. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74314>.
 - [28] An Y, Wang Y, Wang X, Xiao J. Development of chloroplast transformation and gene expression regulation technology in land plants. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13: 1037038. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1037038>.
 - [29] Liu YX, Li F, Gao L, Tu Z, Zhou F, Lin Y. Advancing approach and toolbox in optimization of chloroplast genetic transformation technology. *Journal of Integrative Agriculture*. 2023;22(7): 1951–1966. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2023.02.031>.
 - [30] Yue M, Chen H, Xuan L, Yang Y, Chong X, Li M, et al. Novel molecular markers for *Taxodium* breeding from the chloroplast genomes of four artificial *Taxodium* hybrids. *Frontiers in Genetics*. 2023;14: 1193023. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1193023>.
 - [31] Go S, Koo H, Jung M, Hong S, Yi G, Kim YM. Pan-chloroplast genomes for accession-specific marker development in *Hibiscus syriacus*. *Scientific Data*. 2024;11(1): 246. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03077-7>.

