



Васкулярна анатомія та морфологія квітки *Allium victorialis* L. Sp. Pl. (Amaryllidaceae J.St.-Hil.)

Оксана Фіщук

Волинський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна

Адреса для листування: Fishchuk.Oksana@vnu.edu.ua

Отримано: 29.03.23; прийнято до друку: 10.06.23; опубліковано: 29.06.23

Резюме. Вивчено морфологічну будову та васкулярну анатомію квітки *Allium montanum*. Описані нові мікоморфологічні ознаки вертикальної зональності гінецею, васкулярної анатомії квітки та будови септального нектарника, які раніше не використовувались у систематиці родини *Amaryllidaceae*. Мікоморфологічні препарати 15 квіток *Allium montanum* були виготовлені, використовуючи стандартні методи просочення рослинного матеріалу парафіном. Описані виготовлені зрізи квітки на стадії бутону завтовшки 15-20 мкм за допомогою ротаційного мікротому. Нами встановлена наявність трьох вертикальних зон у гінецеї *Allium montanum*: синасцидіатна зона, симплікатна структурна зона, та гемісимплікатна зона. Мікоморфологію та васкулярну анатомію квітки вивчали за допомогою поперечних зрізів квіток. Квітконіжка *Allium montanum* містить 8 провідних пучків, які вище формують провідний циліндр, від якого на рівні квітколожа відходять сліди листочків оцвітини та сліди тичинок, а ще вище – сліди дорзальних пучків плодолистка. Тичинки відокремлюються від зав'язі. Стовпчик занурений у зав'язь, гінобазичний. У центрі залишається коло з дрібних провідних пучків – корені вентрального комплексу, які вище на рівні появи гнізд реорганізуються у парні провідні пучки – вентральні пучки плодолистка. Насінних зачатків по 2 у кожному гнізді, слід насінного зачатка однопучковий. Дорзальні провідні пучки однопучкові. Вище від гнізд зав'язі вентральні пучки плодолистка закінчуються сліпо. Сліди зовнішніх листочків оцвітини та внутрішніх листочків оцвітини однопучкові. Слід тичинки однопучковий.

Нові отримані ознаки мікоморфології та васкулярної анатомії квітки *Allium montanum* допоможуть нам у вивченні інших представників роду *Allium* та дадуть можливість порівняти отримані морфологічні та анатомічні особливості з ознаками, вивченими нами раніше у представників *Amaryllidaceae* для можливості їх використання у систематиці родини.

Ключові слова: *Allium victorialis*, гінецей, зав'язь, провідні пучки, септальний нектарник.

Vascular anatomy and flower morphology in *Allium victorialis* L. Sp. Pl. (Amaryllidaceae J.St.-Hil.)

Oksana Fishchuk

Lesya Ukrainka Volyn European National University Lutsk, Ukraine

Correspondence: Fishchuk.Oksana@vnu.edu.ua

Abstract. The morphological structure and vascular anatomy of the *Allium montanum* flower were studied. New micromorphological features of the vertical zonality of the gynoecium, the vascular anatomy of the flower and the structure of the septal nectary, which were not previously used in the taxonomy of the *Amaryllidaceae* family were described. Micromorphological preparations of 15 flowers of *Allium montanum* were prepared using standard methods of impregnation of plant material with paraffin. Sections of a flower at the bud stage with a thickness of 15-20 μm using a rotary microtome were described. We established the presence of three vertical zones in the gynoecium of *Allium montanum*: the synascidiate zone, the symplicate structural zone and the hemisymphicate zone. Flower micromorphology and vascular anatomy were studied using cross-sections of flowers. The peduncle of *Allium montanum* contains 8 vascular bundles, which form a vascular cylinder above, from which traces of tepals and traces of stamens depart at the level of the corolla, and even higher - traces of dorsal carpel bundles. Stamens separate from the ovary. The style is immersed in the ovary, gynobasic. In the center remains a circle of small vascular bundles - the roots of the ventral complex, which are reorganized higher at the level of the appearance of the locules into paired vascular bundles - the ventral carpel bundles. There are 2 ovules in each locule, the trace of the ovule is single-bundle. Dorsal vascular bundles are

single-bundled. Above the ovary locules, the ventral carpel bundles end blindly. Traces of outer tepals and inner tepals are single-bundled. The trace of the stamen is single-bundled.

The newly obtained features of the micromorphology and vascular anatomy of the *Allium montanum* flower will help us in the study of other representatives of the genus *Allium* and will give us the opportunity to compare the obtained morphological and anatomical features with the features we previously studied in representatives of the Amaryllidaceae for the possibility of their use in the family taxonomy.

Key words: *Allium victorialis*, gynoecium, ovary, vascular bundles, septal nectary.

ВСТУП

Систематика родини *Amaryllidaceae* згідно молекулярних даних містить три підродини (*Agapanthoideae*, *Allioideae*, *Amaryllidoideae*), 73 роди та більше 1600 видів [1, 14], але існує дискусія щодо виділення триб та родів. Для створення системи родини не були враховані морфологічні ознаки квітки та ознаки васкулярної анатомії. Саме тому вивчення мікроморфології та внутрішньої структури гінецея є досить актуальним для сучасної систематики, нові ознаки будови провідної системи квітки, будова септальних нектарників не врахована у побудові філогенетичних дерев. Нами раніше були вивчені деякі яскраві представники родини *Amaryllidaceae* [5-9].

Підродина *Allioideae* включає 13-16 родів і 750 видів [2], які об'єднані у чотири триби: *Allieae*: *Allium* L., *Gilliesiae*, *Leucocoryneae*, *Tulbaghieae*. Рід *Allium* з 260-700 видами поширений у північній півкулі [12].

Дослідженням екологічних особливостей *Allium victorialis* на території Українського Розточчя займалися українські вчені. Було встановлено флористичний склад локалітетів з участю цього виду, описано основні фенологічні фази розвитку *Allium victorialis* в місцях поширення. Встановлено флуктаційний тип динаміки щільності ценопопуляції, сталість характеру вікового спектра з максимумом на групі особин віргінільного стану, значну кількість ювенільних особин, що може свідчити про добре насіннєве поновлення та сприятливі умови для проростання насіння. Ценопопуляцію дослідники віднесли до молодого типу, вона характеризується рівноважним типом віталітетної структури. Встановлена висока інтенсивність утворення плодів, але характеризується низькою часткою занасінення і невисоким значенням коефіцієнта продуктивності. Описано, що врожайність насіння більше залежить від щільності генеративних особин, ніж від значення фактичної насіннєвої продуктивності. Авторами запропоновано списки роду *Allium* для Українського Розточчя доповнити видом *Allium victorialis* та внести його до нового Переліку видів судинних рослин, що потребують охорони в межах Львівської області [17].

Гори Чанбайшань є одним із основних районів розповсюдження *A. victorialis* у Китаї і цей вид знаходиться під загрозою зникнення через зміни середовища існування та надмірну експлуатацію. Однак зародкова плазма *A. victorialis* систематично не збиралася та не вивчалася. Мета дослідження полягала в отриманні детальної генетичної інформації, аналізі генетичного різноманіття та подальшому сприянні захисту зародкової плазми *A. victorialis* у

цих горах. Транскриптомний аналіз проводили з шістьма зразками *A. victorialis*, зібраними у горах Чанбайшань. Принаймні 146 759 генів для кожного зразка було отримано після виконання de novo збирання даних РНК-seq, і було виявлено, що принаймні 92 % цих генів мають лише одну ізоформу мРНК. Філогенетичний аналіз показав, що *A. victorialis* генетично віддалена від деяких споріднених видів, таких як *Allium sativum*, *Allium fistulosum* і *Allium cepa*, але генетично близький до *Allium tuberosum*. Два *A. victorialis* var. зразки *Listera* були філогенетично відокремлені від інших чотирьох зразків, і ці два зразки слід розглядати як *Allium listera*. Це дослідження закладає основу для майбутніх досліджень генетичного різноманіття та еволюції видів *Allium*, а також для збереження зародкової плазми *A. victorialis* з гір Чанбайшань та інших популяцій цього виду [4].

В останні роки *Allium victorialis* широко використовується як фармакологічний засіб для різних захворювань у формі антиартеросклеротичного, протидіабетичного та протиракового. *Allium victorialis* сильно вражається різними грибовими захворюваннями, оскільки в природних умовах росте в тінистому та вологому середовищі Кореї. У цьому випадку застосовуються різні типи фунгіцидів для боротьби з грибовими захворюваннями *Allium victorialis*. Дослідження корейських вчених було спрямоване на визначення залишкових характеристик двох фунгіцидів, а саме тебуконазолу та флудіоксонілу на *Allium victorialis*. Для цього дослідження фунгіцидами змочували ґрунт під *Allium victorialis* у зоні культивування стандартним (у дві тисячі разів) і подвійним (у тисячі разів) розведеннями. Наприкінці 15, 30 та 40 днів було зібрано зразки для аналізу залишків. Залишки тебуконазолу та флудіоксонілу були проаналізовані за допомогою GC/NPD (газової хроматографії/азотно-фосфорного детектора), і виявлено, що їх вилучення становить 108,8~119,5 % та 91,3~104,8 % відповідно. На основі результатів, отриманих у цьому дослідженні автори припускають, що залишкові рівні обох фунгіцидів на *Allium victorialis* є безпечними, і ці фунгіциди також можна використовувати для боротьби з грибовими захворюваннями *Allium victorialis* [16].

Дослідження інших корейських вчених мало на меті визначити різницю в рентабельності системи землеробства *Allium victorialis* між польовими та підлісковими системами, а також запропонувати кілька кращих шляхів для розвитку системи землеробства *Allium victorialis* під лісом. Опитування було проведено серед 12 фермерів, щоб дослідити виробничі витрати, витрати на управління, затрати праці.

Рентабельність *Allium victorialis* з підліскового господарства була не нижчою, ніж інших недеревних продуктів лісу. Висновком даного дослідження стало створення високої рентабельності на польових фермах, за умови підтримки технічного розвитку для інтенсивного землеробства [11].

Вивчення антиоксидантної активності та цитотоксичності ферментованого екстракту *Allium victorialis* є досить актуальним для сьогодення. Загальний вміст поліфенолів в екстракті *A. victorialis* становив 2,63 мг/г, а у ферментованому екстракті *A. victorialis* - 1,65 мг/г, який трохи зменшився під час бродіння. Загальний вміст флавоноїдів в екстракті *A. victorialis* становив 57,77 мг/г, а у ферментованому екстракті *A. victorialis* - 62,27 мг/г, і цей показник міг дещо збільшитися в результаті бродіння. Електронодонорна здатність екстракту *A. victorialis* була нижчою, ніж вітаміну С (97,71 %), але до ферментації вона становила 82,29 %, а після ферментації стала 82,40 %. Здатність екстракту *A. victorialis* поглинати нітриту до та після бродіння показала нижче числове значення, ніж бутильований гідрокситолуол при рН 2,5; Супероксиддисмутазо-подібна активність показала відносно низький рівень, 15 %. Виробництво нітритів збільшується екстрактом *A. victorialis*, але пригнічується після бродіння. Вміст метилдіамфетаміну (MDA) був пригнічений підвищеною концентрацією екстракту *A. victorialis*. Таким чином, вироблення пероксиду ліпідів (LPO) пригнічувалося екстрактом *A. victorialis*. Життєздатність клітин фібробластів мала тенденцію до незначного зниження при збільшенні концентрації екстракту *A. victorialis*, але не відрізнялася від контролю [3].

Проведене дослідження сили та енергії проростання насіння *Allium victorialis*. Незважаючи на нормальну структуру насіння, що містить життєздатний ембріон і відповідність усім рекомендаціям Міжнародної асоціації тестування насіння, проростання *A. victorialis* не спостерігалось. Крім того, застосовані обробки скарифікацією та стратифікацією не покращили динаміку проростання насіння *A. victorialis*. Мікробіологічний аналіз ґрунту, відібраного з природних осередків рослини, виявив типовий склад бактерій і грибів. Висока кількість грибів та різних груп бактерій виявлені в ґрунті навколо коріння. В середині коренів *A. victorialis* кількість мікроорганізмів зменшилася в 1000-10 000 разів, але виявлено всі досліджувані мікробні групи, особливо копіотрофні бактерії та гриби. Спостерігалися зміни таких показників, як активність дегідрогенази, значення рН, вміст загального органічного С (ТОС) в окремих частинах ризосфери та порівняно з ризосферою з ґрунтом навколо коріння [15].

Вивчення представників роду *Allium* є досить актуальним, зокрема всебічне вивчення *Allium victorialis*. Проте внутрішня будова гінецея та васкулярна анатомія квітки *Allium victorialis* не вивчалась раніше, проте *Allium cepa*, був вивчений нами раніше. Мета нашої роботи це з'ясування нових

особливостей морфології квітки і внутрішньої структури гінецея у *Allium victorialis*.

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ

Квітки *Allium victorialis* були зібрані у Ботанічному саду імені академіка Олександра Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка на стадії бутону перед розкриванням і цвітінням та зафіксовані у 70 % етанолі. Препарати серій поперечних зрізів десяти квіток завтовшки 20 мкм виготовлено згідно зі стандартною методикою [13]. Зрізи зафарбовані Сафраніном (Safranin) і Астра-Блау (Astra Blau) та залиті в Еукітт (Eukitt). Цифрові мікрофотографії зроблені за допомогою мікроскопа AMSCOPE T490B-10M (США) та цифрової камери AMSCOPE 10MP MU1000 (США). Висоту вертикальних зон заяві обчислювали за сумою поперечних зрізів. Внутрішню структуру гінецея аналізували згідно з концепцією вертикальної зональності гінецея В. Ляйнфельнера [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Квіти *Allium victorialis* довжиною 0,9-1,1 см, актиноморфні, біло-зеленого кольору. Квітконіс 70-80 см довжиною та 0,6-0,8 см у діаметрі, суцвіття – сферичний зонтик із великою кількістю квіток на тонких квітконіжках. Квітконіжка 1,8-2 см довжиною і 0,1 см у діаметрі. (рис.1, А).

Листочків оцвіттини шість; квіткова трубка 0,1 см; зовнішні листочки оцвіттини 0,9 см завдовжки та 0,45 см завширшки, а внутрішні листочки оцвіттини довжиною 1 см та шириною 0,5 см.

Тичинок шість; всі вільні. Внутрішні тичинкові нитки 1,3 см завдовжки та 0,05 см у діаметрі, зовнішні тичинкові нитки мають циліндричну форму, довжину 1,2 см та діаметр тичинкової нитки 0,05 см. Пиляки лінійні, інтрорзні, дорзифіксні, пиляки зовнішніх тичинок довжиною 0,45 см завдовжки та 0,1 см у діаметрі, клиноподібні, пиляки внутрішніх тичинок 0,4 см завдовжки та 0,1 см у діаметрі. Пиляки кріпляться до тичинкової нитки непорушно (рис. 1, Б).

Гінецей довжиною 1,6 см. Зав'язь верхня, довжиною 0,6 см та 0,5 см у діаметрі, куляста, трьохгранна, з випуклими гніздами зеленого кольору, стовпчик 0,9 см і 0,05 см у діаметрі (рис. 3, Д). Приймочка трилопатева довжиною 0,1 см (рис. 1, В).

Плід – локуліцідна коробочка, трикутна, зверху сплюснена. Насінини шаровидні, кутасті, чорні.

У верхній частині квітконіжки, в основі квіткової трубки, у тичинкових нитках і в стінці зав'язі наявні ідіобласти з клітинними включеннями – рафідами. У вільних верхівках листочків оцвіттини, в'язальці та стовпчику вони відсутні.

У зав'язі *Allium victorialis* ми виділяємо такі структурні зони: стерильну синасцидіатну зону висотою 180 мкм, фертильну симплікатну структурну зону, висота якої приблизно 140 мкм (рис. 2) та гемісимплікатну зону висотою орієнтовно 200 мкм (рис. 3, Г).

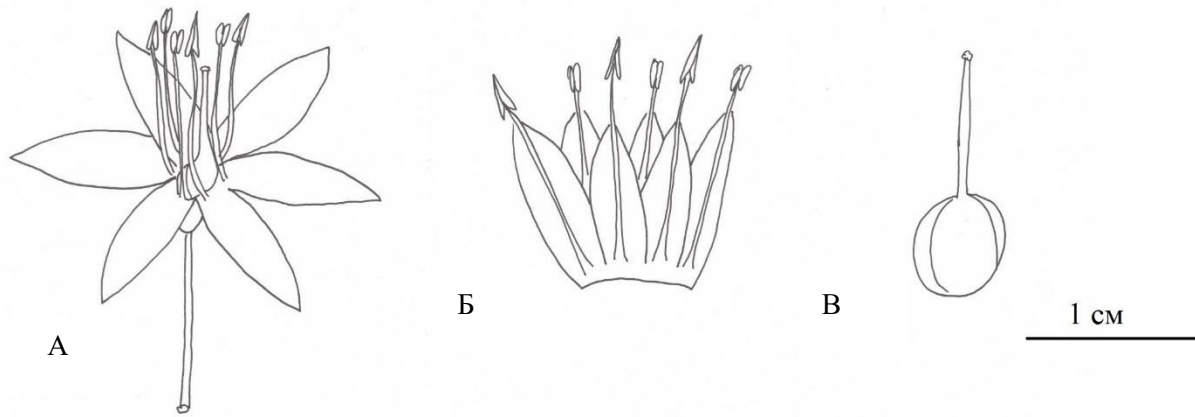


Рис. 1. Морфологія квітки *Allium victorialis* L. Sp. Pl.: А – загальний вигляд квітки, Б – розгорнута оцвітина та андроцей, В – маточка

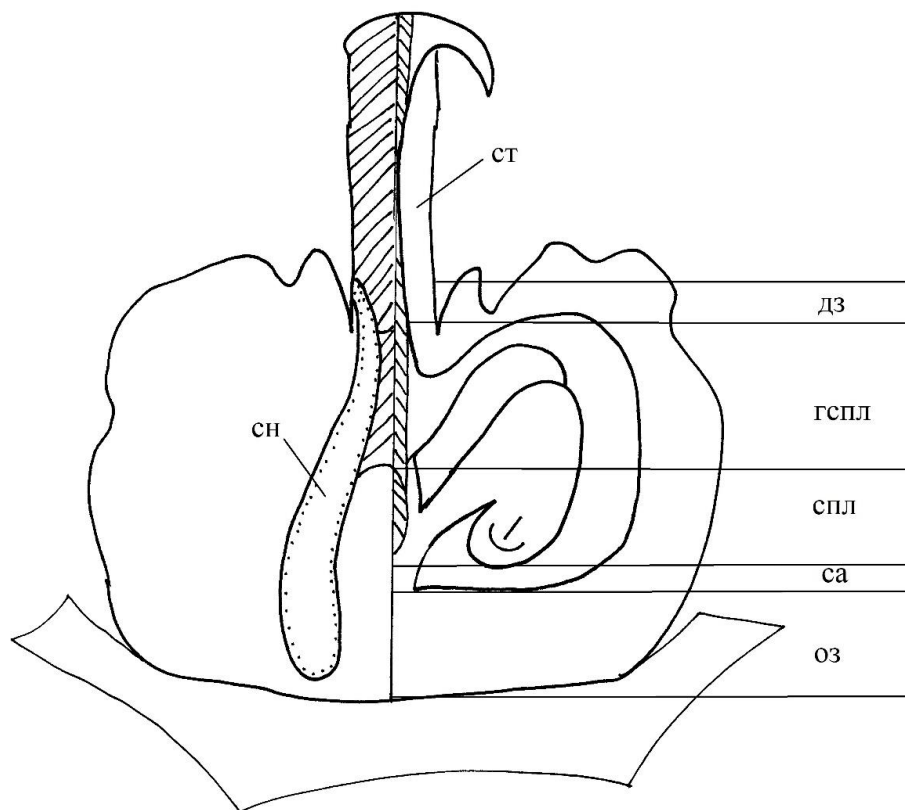


Рис. 2. Вертикальна зональність зав'язі *Allium victorialis* L. Sp. Pl.: дз – дах зав'язі; гспл – гемісимплекатна зона зав'язі; са – синасцидіатна зона зав'язі; сн – септальний нектарник; спл – симплекатна зона зав'язі; ст – стовпчик; оз – основа зав'язі

Септальні нектарники з'являються нижче від гнізд зав'язі на 160 мкм і характеризуються наявністю трьох зон септального нектарника: зони роздільного, зони «ліліюїдного» об'єднаного нектарника та зони зовнішнього нектарника. Загальна висота септального нектарника – 680 мкм (рис. 2, рис. 3, Г-Е). Основа зав'язі становить 400 мкм (рис. 2, рис.3, В). Дах зав'язі – 140 мкм (рис. 3, Є).

Квітконіжка *Allium montanum* містить 8 провідних пучків (рис. 3, А), які вище формують провідний циліндр, від якого на рівні квітколожа відходять сліди листочків оцвітини та сліди тичинок, а ще вище – сліди дорзальних пучків плодолистка (рис. 3,

Б). Тичинки відокремлюються від зав'язі. Стовпчик занурений у зав'язь, гінобазичний. У центрі залишається коло з дрібних провідних пучків – корені вентрального комплексу (рис.3, В), які вище на рівні появи гнізд реорганізуються у парні провідні пучки – вентральні пучки плодолистка (рис. 3, Д). Насінних зачатків по 2 у кожному гнізді, слід насінного зачатка однопучковий. Дорзальні провідні пучки однопучкові (рис. 3, Д-Е). Вище від гнізд зав'язі вентральні пучки плодолистка закінчуються сліпо (рис. 3, Є). Сліди зовнішніх листочків оцвітини та внутрішніх листочків оцвітини однопучкові (рис. 3, Ж). Слід тичинки однопучковий.

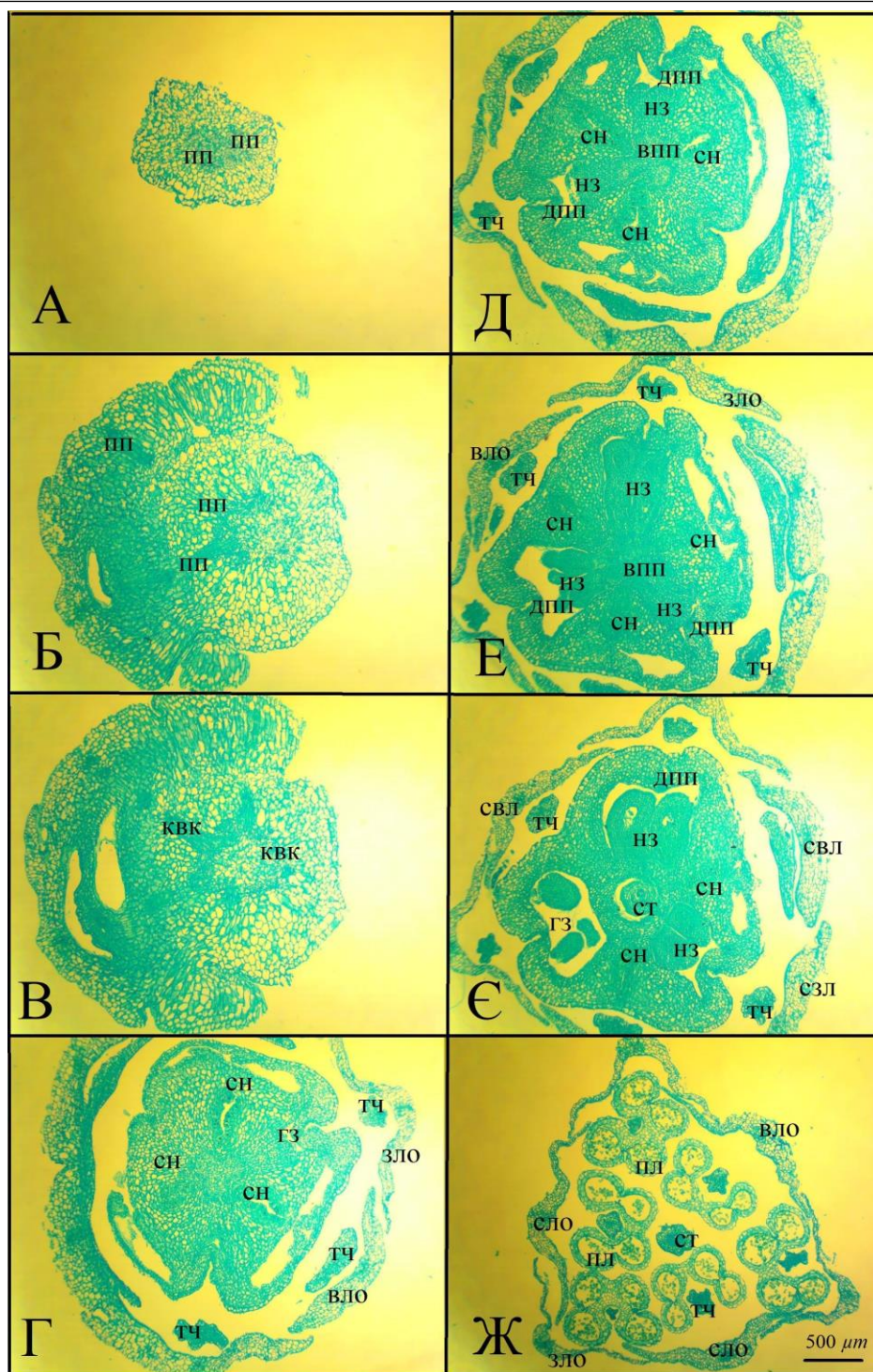


Рис. 3. Серія поперечних зрізів квітки *Allium montanum*: А – квітконіжка; Б – нижня зав'язь; В – основа зав'язі; Г – синасцидіатна зона зав'язі; Д-Є – середня частина зав'язі і дах зав'язі; Ж – стовпчик, тичинки та пиляки; вло – внутрішні листочки оцвітчини; впп – вентральні провідні пучки; гз – гніздо зав'язі; квк – корні вентрального комплексу; дпп – дорзальні пучки плодолистка; зло – зовнішні листочки оцвітчини; нз – насінний зачаток; оз – основа зав'язі; пп – провідні пучки; сн – септальний нектарник; тч – тичинка; ст – стовпчик; сло – слід листочка оцвітчини; тч – тичинка

ВИСНОВКИ

У зав'язі *Allium montanum* наявні три вертикальні структурні зони: стерильну синасцидіатну зону, фертильну симплікатну структурну зону та гемісимплікатну зону. Септальні нектарники з'являються нижче від гнізд зав'язі і характеризуються

наявністю трьох зон септального нектарника: зони роздільного, зони «ліліюїдного» об'єданого нектарника та зони зовнішнього нектарника. Загальна висота септального нектарника – 680 мкм. Васкулярна система квітки *Allium montanum* характеризується наявністю 8 провідних пучків у квітконіжці, які вище формують провідний циліндр, від якого на

рівні квітколожа відходять сліди листочків оцвітини та сліди тичинок, а ще вище – сліди дорзальних пучків плодолистка. У центрі зав'язі наявні корені вентрального комплексу, які дають початок вентральним пучкам плодолистка. Сліди зовнішніх листочків оцвітини та внутрішніх листочків оцвітини однопучкові. Слід тичинки однопучковий. Вивчення мікроморфологічних ознаки зав'язі та структури септального нектарника є дуже важливими ознаками для диференціації представників родини *Amaryllidaceae*.

ЛІТЕРАТУРА

- Chase, M. W.; Christenhusz, M. J. M.; Fay, M. F.; Byng, J. W.; Judd, W. S.; Soltis, D. E.; Mabberley, D. J.; Sennikov, A. N.; Soltis, P. S.; Stevens, P. F. The angiosperm phylogeny group. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016, 181, pp. 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Chase, M.W.; Reveal, J. L.; Fay, M. F. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2009, 161, pp. 132–136. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00999.x>
- Doh, E.-S.; Chang, J.-P.; Kil, K.-J.; Choi, M. S.; Yang, J.-K.; Yun, C.-W.; Lee, K. H. Antioxidative Activity and Cytotoxicity of Fermented *Allium victorialis* L. Extract. *Korean Journal of Plant Resources*. 2011, 24(1), pp. 30–39. <https://doi.org/10.7732/KJPR.2011.24.1.030>
- Feng, B.; Wang, X.; Chen, S.; Zhang, Y.; Su, X.; Song, S. Transcriptome analysis and genetic diversity of *Allium victorialis* germplasms from the Changbai Mountains. *Mitochondrial DNA Part B*. 2021, 6:10, pp. 2915–2923. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1972857>
- Fishchuk, O. Comparative flower morphology in *Cyrtanthus elatus* (Amaryllidaceae). *Modern Phytomorphology*. 2021, 15(1), pp. 21–23. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5801087>
- Fishchuk, O. Comparative flower morphology in *Hippeastrum striatum* (Lam.) H.E. Moore. (Amaryllidaceae). *Ukrainian Journal of Ecology*. 2021, 11(1), pp. 273–278. https://10.15421/2021_240
- Fishchuk, O. Micromorphology of the flower of *Zephyranthes lindleyana* (Amaryllidaceae). *Modern Phytomorphology*. 2021, 15(2), pp. 35–37. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5078277>
- Fishchuk, O., Odintsova, A. Comparative flower micromorphology and anatomy in *Hymenocallis spesiosa* and *Narcissus pseudonarcissus* (Amaryllidaceae). *Ukrainian Journal of Ecology*. 2021, 11 (3), pp. 178–187. https://doi.org/10.15421/2021_161
- Fishchuk, O.S. Micromorphology and anatomy of the flower of *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb. (Amaryllidaceae). *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021, 12(2), pp. 192–198. <https://doi.org/10.15421/022127>
- Leinfellner, W. Der Bauplan des syncarpen Gynoeceums. *Österr. Bot. Zeitschr.* 1950, 97(3-5), pp. 403–436.
- Park, S.-B.; Kim, M.-J.; Kim, E.-G. Comparison of Profitability for *Allium victorialis* Farming System between On-field and Under-forest. *Journal of Korean Forest Society*. 2014, 103(1), pp. 122–128. <https://doi.org/10.14578/JKFS.2014.103.1.122>
- Rahn, K. A. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin, 1998, 3, pp. 70–78.
- Soukup, A.; Tylová, E. Essential methods of plant sample preparation for light microscopy. *Plant Cell Morphogenesis. Methods in Molecular Biology*. 2019, 1992, pp. 1–26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9469-4_1
- Stevens, P. F. *Angiosperm Phylogeny Website*. 2020. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Winiarczyk, K.; Skrzypczak, K.; Jarozuk-Sciseł, J.; Bocianowski, J. Investigations of the capacity and strength of seed germination in *Allium victorialis* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2014, 83(3), pp. 219–228. <http://dx.doi.org/10.5586/asbp.2014.021>
- Woo, M.-J.; Hur, K.-J.; Kim, J.-Y.; Saravanan, M.; Kim, S.-W.; Hur, J.-H. Residual characteristic of tebuconazole and fludioxonil in *Allium victorialis* (*Allium ochotense* Prokh.). *The Korean Journal of Pesticide Science*. 2015, 19(4), pp. 354–360. <https://doi.org/10.7585/kjps.2015.19.4.354>
- Lyubynets' I. P., Khomyn I. G. Стан ценопопуляції *Allium Victorialis* L. на території Українського Розточчя. *Науковий вісник НІТУ України*. 2018, 28(10), с. 36–40. <https://doi.org/10.15421/40281007>