

АГРОНОМИЯ

4.1.2 Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Научная статья

УДК 631.52

<https://doi.org/10.28983/asj.y2026i1pp41-46>

**Оценка транскрипционной активности генов *DREB2* и *rbcl*  
у *Robinia pseudoacacia* L. в условиях моделируемой почвенной засухи**

**Анна Вадимовна Третьякова, Полина Алексеевна Зыбинская, Павел Андреевич Крылов**

Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения  
Российской академии наук, г. Волгоград, Россия

e-mail: krylov-p@vfanc.ru

**Аннотация.** *Robinia pseudoacacia* L. (белая акация) – одна из наиболее широко распространенных древесных пород, используемых в защитном лесоразведении в условиях засушливого климата, характерного для южных регионов России. Однако, несмотря на практическую значимость *R. Pseudoacacia*, молекулярно-генетические механизмы ее адаптации к засухе остаются недостаточно изученными. Нами была проведена оценка транскрипционной активности генов *DREB2* и *rbcl* у сеянцев *R. pseudoacacia* в условиях моделируемой почвенной засухи. Одновременно с этим была проведена визуальная оценка растений по шкале увядания. В группе с умеренной засухой признаки увядания не наблюдались, тогда как в группе с сильной засухой они появились уже на 3-й день, а к 9-му дню большинство растений сильно увяло. Статистически значимые различия по шкале увядания выявлены на 3-й, 5-й и 9-й дни эксперимента как между группами, так и внутри группы с сильной засухой. Было установлено, что транскрипционная активность *rbcl* оставалась стабильной в условиях засухи, тогда как активность *DREB2* значительно варьировалась в зависимости от уровня водного стресса. Максимальный уровень транскрипционной активности *DREB2* наблюдался на 3-й день эксперимента при сильной засухе с последующим снижением на 5-й день. На 5-й и последующие дни при снижении транскрипционной активности *DREB2* происходило дальнейшее усиление увядания растений из группы сильная засуха. Полученные данные углубляют понимание механизмов адаптации *R. pseudoacacia* к засушливым условиям и могут быть использованы для разработки селекционных программ по повышению устойчивости данного вида и других растений к дефициту влаги.

**Ключевые слова:** *Robinia pseudoacacia* L., транскрипционная активность генов, засуха, шкала увядания, *DREB2*, *rbcl*

**Для цитирования:** Третьякова А. В., Зыбинская П. А., Крылов П. А. Оценка транскрипционной активности генов *DREB2* и *rbcl* у *Robinia pseudoacacia* L. в условиях моделируемой почвенной засухи // Аграрный научный журнал. 2026. № 1. С. 41–46. <https://doi.org/10.28983/asj.y2026i1pp41-46>.

AGRONOMY

Original article

**Evaluation of the *DREB2* and *rbcl* genes transcriptional activity  
in *Robinia pseudoacacia* L. under simulated soil drought conditions**

**Anna V. Tretyakova, Polina A. Zybinskaya, Pavel A. Krylov**

Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre of Agroecology, Complex Melioration and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences”, Volgograd, Russia

e-mail: krylov-p@vfanc.ru

**Abstract.** *Robinia pseudoacacia* L. (black locust) is one of the most widespread tree species used in protective afforestation under arid climate conditions typical of the southern regions of Russia. However, despite the practical significance of *R. pseudoacacia*, the molecular-genetic mechanisms of its adaptation to drought remain poorly understood. We evaluated the transcriptional activity of the *DREB2* and *rbcl* genes in *R. pseudoacacia* seedlings under simulated soil drought conditions. At the same time, a visual assessment of the plants was carried out according to the wilting scale. There were no signs of wilting in the group with moderate drought, whereas in the group with severe drought they had already appeared by the 3rd day, and the most plants had wilted significantly by 9th day. Statistically significant differences according to the wilting scale were observed on the 3rd, 5th and 9th days of the experiment both between the groups and within the group with severe drought. It was found that the transcriptional activity of *rbcl* remained stable under drought conditions, whereas the activity of *DREB2*





varied significantly depending on the level of water stress. The maximum level of *DREB2* transcriptional activity was observed on the 3rd day of the experiment under severe drought, followed by a decrease on the 5th day. On the 5th and subsequent days, while the transcriptional activity of *DREB2* decreased, there was a further increase in plant wilting in the group with severe drought. The obtained data enhance our understanding of the adaptation mechanisms of *R. pseudoacacia* to arid conditions and can be used to develop breeding programs to increase the resistance of this species and other plants to moisture deficiency.

**Keywords:** *Robinia pseudoacacia* L., transcriptional activity of genes, drought, wilting scale, *DREB2*, *rbcL*

**For citation:** Tretyakova A. V., Zybinskaya P. A., Krylov P. A. Evaluation of the *DREB2* and *rbcL* genes transcriptional activity in *Robinia pseudoacacia* L. under simulated soil drought conditions. *Agrarnyy nauchnyy zhurnal = Agrarian Scientific Journal*. 2026;(1):41–46. (In Russ.). <https://doi.org/10.28983/asj.y2026i1pp41-46>.

**Введение.** *R. pseudoacacia* – один из наиболее распространенных быстрорастущих видов деревьев, произрастающих в условиях засушливого климата на территории Юга России. Благодаря такими важными свойствам, как быстрый рост, высокая устойчивость к засухе, засолению почвы, а также наличию ажурной раскидистой кроны *R. pseudoacacia* активно используется в качестве основной древесной породы для создания защитных лесных насаждений, в том числе в ветрозащитных полосах, а также городского озеленения. Кроме того, *R. pseudoacacia* применяется при борьбе с эрозией почв, а также может произрастать на бедных и загрязненных почвах, что делает ее ценной древесной породой для восстановления территорий после открытых горных работ, промышленных загрязнений и других антропогенных воздействий [1–3].

Для эффективного использования *R. pseudoacacia* в защитном лесоразведении и ускорения ее селекции необходимо более глубокое понимание механизмов адаптации данной породы к стрессовым условиям. Исследование ответа *R. pseudoacacia* на засуху на молекулярно-генетическом уровне поможет понять специфичные реакции, в частности изменение транскрипционной активности генов, которые обеспечивают высокую адаптацию *R. pseudoacacia* к засушливым условиям, характерным для южных регионов России. Одним из важнейших молекулярно-генетических механизмов адаптации растений к стрессам является изменение активности генов под действием транскрипционных факторов (ТФ). Ген *DREB2* кодирует ТФ, транскрипционная активность которого повышается в ответ на абиотические стрессы, включая засуху [9]. Этот ТФ связывается с специфическими последовательностями ДНК в промоторных областях генов-мишеней, участвующих в ответе на стресс, активируя их транскрипцию. Исследования на модельном растении *Arabidopsis thaliana* L. показали, что сверхэкспрессия *DREB2A* приводит к повышению устойчивости к засухе и высоким температурам [5, 7].

Ген *rbcL*, кодирующий большую субъединицу рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы (RuBisCO), также представляет интерес в контексте устойчивости растений к засухе. RuBisCO является ключевым ферментом в процессе фиксации углерода при фотосинтезе. Исследования показали, что транскрипционная активность *rbcL* может изменяться в ответ на высокие температуры и засуху, что отражает реакцию фотосинтетического аппарата к стрессовым условиям [12].

Полученные данные о транскрипционной активности рассматриваемых генов *DREB2* и *rbcL* могут быть использованы для совершенствования селекции *R. pseudoacacia*, направленной на повышение устойчивости растений к засухе. Это, в свою очередь, может способствовать повышению эффективности мероприятий по агролесомелиорации и борьбе с эрозией почв в засушливых регионах.

Цель данной работы – изучить реакцию *R. pseudoacacia* в ответ на засуху путем оценки морфологических параметров и транскрипционной активности генов *DREB2* и *rbcL*.

**Материалы и методы.** Семена *R. pseudoacacia* были собраны в конце сентября 2023 г. в защитной лесной полосе питомника ФНИЦ агроэкологии РАН со здоровых деревьев возрастом 12–15 лет. Перед посадкой семена подвергали термической скарификации методом ошпаривания, затем они были посеяны в индивидуальные пластиковые горшки с грунтом объемом 0,75 л и в дальнейшем содержались в условиях теплицы «Фитотрон» ФНИЦ агроэкологии РАН при температуре 25–27 °С и влажности воздуха 30–40 %. Было сформировано три группы по 10 растений в каждой: контрольная (75–80 % НВ) и две экспериментальные с умеренной (40–50 % НВ) и сильной (не более 10 % НВ) почвенной засухой. Эксперимент был начат в день, когда влажность почвы каждой группы достигла вышеуказанных значений. Мониторинг содержания влаги в почве проводили



ежедневно в 10 часов утра с помощью влагомера Landtek MC-7828 SOIL (AZ Instrument, Китай). В 1-й, 3-й, 5-й и 9-й день эксперимента производили визуальную оценку растений по 6-балльной шкале увядания [6], измерение прироста надземной части растений с помощью линейки (см), а также одновременно производили сбор листовых пластинок. Выделение РНК из листьев и ОТ-ПЦР-РВ с референсным геном *ACT*, отобранном нами ранее как наиболее стабильно экспрессирующимся в условиях засухи у *R. pseudoacacia*, проводили по методике, описанной ранее [15]. В таблице 1 указаны нуклеотидные последовательности праймеров и их температуры отжига  $T_m$ . Праймеры к генам *rbcL* и *DREB2* были подобраны с помощью онлайн-сервиса Primer-BLAST, а праймеры к гену *ACT* взяты из [14]. Относительная транскрипционная активность целевых генов была рассчитана по методу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [10].

Таблица 1 – Последовательности праймеров и температуры их отжига

Table 1 – Primers sequences and annealing temperatures

Ген	Прямой (5'→3')	Обратный (5'→3')	Температура отжига ( $T_m$ ), °C
<i>DREB2</i>	GGGAAATGGGTCGCTGAGAT	GCGAGCGTTTTACCCCTTA	64
<i>rbcL</i>	CTTGAATGCTACTGCGGGTA	ATCCCGGCAATAGTGAGC	58
<i>ACT</i>	CAAAGTGATGCCCTTGTGAC	TCGTGGATTGGGTCGGTG	60

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программе Statistica 12.0 (StatSoftInc., США), где были рассчитаны медиана, 1-й и 3-й квартили. Достоверность различий между независимыми выборками оценивалась с помощью критерия Краскела-Уоллиса ( $p < 0,05$ ) с апостериорными попарными сравнениями по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,017$ ), между зависимыми выборками – по критерию Фридмана ( $p < 0,05$ ) с апостериорными попарными сравнениями по критерию Вилкоксона ( $p < 0,017$ ). При апостериорном анализе для коррекции  $p$ -уровня значимости использовалась поправка Бонферрони.

**Результаты исследований.** В начале эксперимента растения *R. pseudoacacia* во всех группах имели здоровый внешний вид: ярко-зеленый цвет и ровная поверхность листовых пластинок, хороший тургор (рисунок 1, А–В). Сеянцы из контрольной группы к концу эксперимента по моделированию почвенной засухи не имели признаков увядания (рисунок 1, Г). В группе с умеренной засухой легкие признаки увядания, такие как небольшое изменение угла наклона листьев и снижение тургора листовых пластинок, наблюдались только у 3 растений в конце эксперимента (рисунок 1, Д). У отдельных сеянцев, подвергшихся сильной засухе, первые признаки увядания появились уже на 3-й день. К 9-му дню 6 растений из этой группы имели сниженный тургор и волнистую поверхность листовых пластинок, изменение их угла наклона, а также пожелтение части листьев (рисунок 1, Е1). У остальных растений из группы с сильной засухой практически все листья засохли (рисунок 1, Е2).

При оценке сеянцев по шкале увядания статистически значимые различия были выявлены только в группе с сильной засухой (таблица 2). По сравнению с контрольной группой они имели более высокий балл по шкале на 3-й, 5-й и 9-й дни эксперимента ( $p = 0,015$ ;  $0,002$ ;  $0,0001$ ). Кроме того, на 5-й и 9-й дни показатели по шкале увядания у растений из этой группы были значимо выше, чем у растений, подвергшихся умеренной засухе ( $p = 0,008$ ;  $0,0009$ ). На 9-й день значения увядания сеянцев внутри группы сильная засуха были выше по сравнению с предыдущими днями эксперимента ( $p = 0,004$ ;  $0,004$ ;  $0,008$ ).

Измерение прироста сеянцев в течение эксперимента показало, что чем ниже влажность почвы, тем медленнее росли растения (см. таблицу 2). Однако различия в приросте не были статистически значимы.

В результате анализа транскрипционной активности генов *DREB2* и *rbcL* у *R. pseudoacacia* в условиях моделируемой засухи было выявлено, что контрольной группы транскрипционная активность *DREB2* не изменялась в течение эксперимента (рисунок 2, А). В 1-й день опыта у группы с умеренной засухой транскрипционная активность *DREB2* была немного ниже по сравнению с контрольной. При сильной засухе в этот же день уровень транскрипционной активности *DREB2* был еще ниже по сравнению с контролем в 1,64 раза ( $p = 0,006$ ). На 3-й день контроль

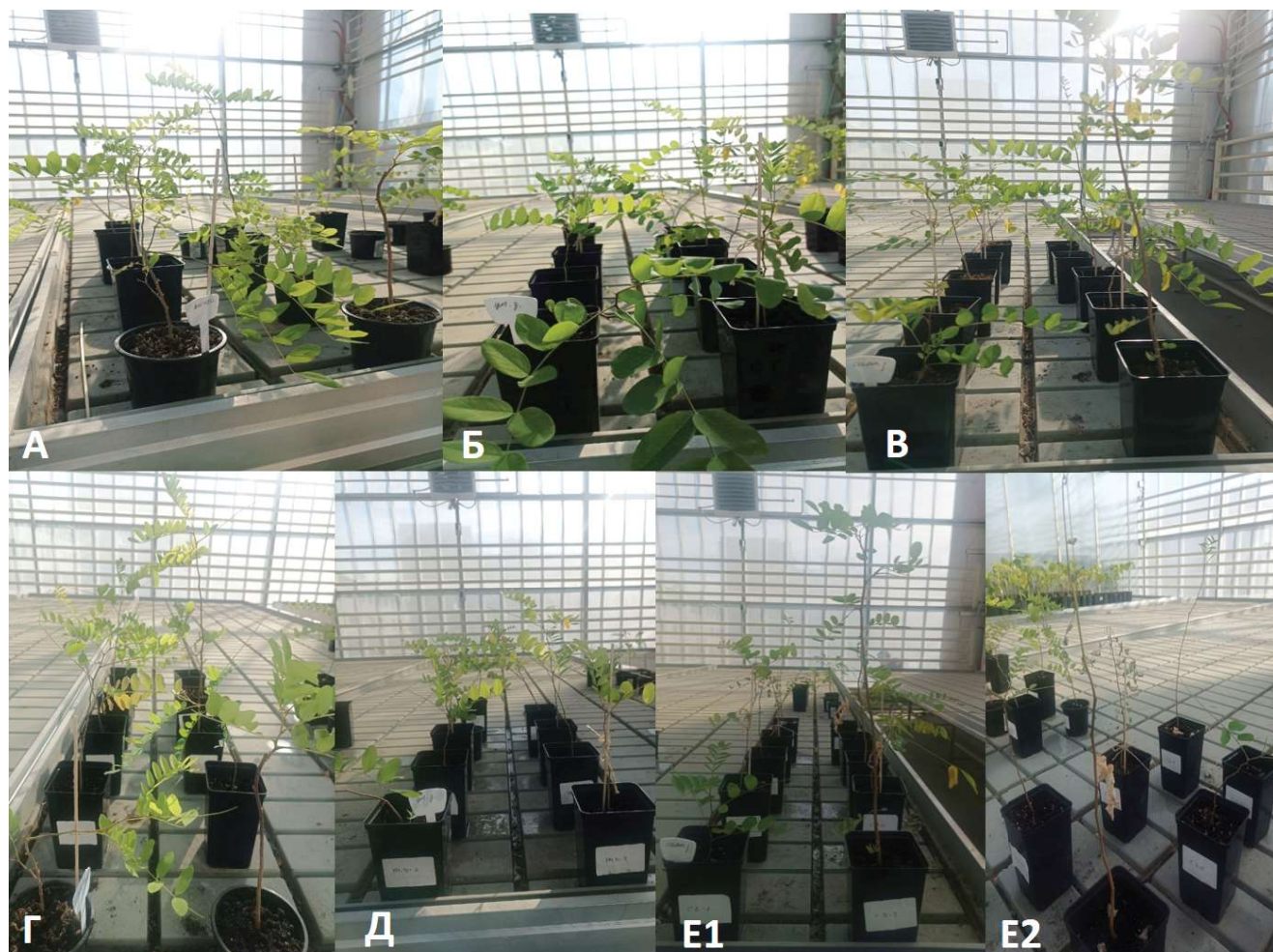


Рисунок 1 – Моделирование почвенной засухи у *R. pseudoacacia*:

*A* – контрольная группа в 1-й день эксперимента; *B* – группа с умеренной засухой в 1-й день эксперимента;  
*C* – группа с сильной засухой в 1-й день эксперимента; *Г* – контрольная группа на 9-й день эксперимента;  
*Д* – группа с умеренной засухой на 9-й день эксперимента;  
*E1, E2* – группа с сильной засухой на 9-й день эксперимента

Figure 1 – Soil drought simulation in *R. pseudoacacia*:

*A* – the control group on the 1st day of the experiment; *B* – the group with moderate drought on the 1st day of the experiment;  
*C* – the group with severe drought on the 1st day of the experiment; *D* – the control group on the 9th day of the experiment;  
*E* – the group with moderate drought on the 9th day of the experiment;  
*F1, F2* – the group with severe drought on the 9th day of the experiment

Таблица 2 – Морфологические параметры сеянцев *R. pseudoacacia*

Table 2 – Morphological parameters of *R. pseudoacacia* seedlings

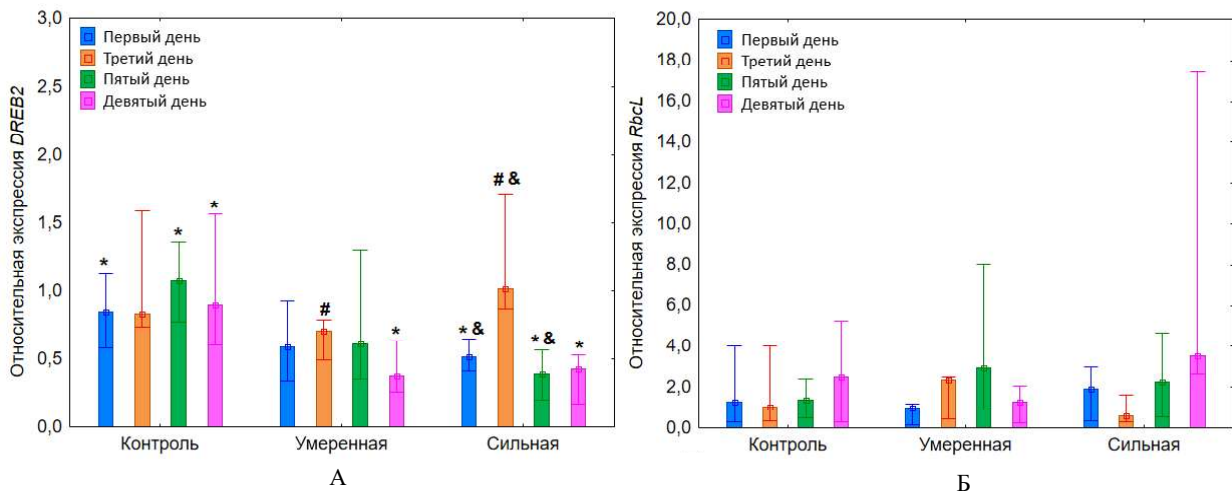
Группа	Ме [Q <sub>1</sub> ÷ Q <sub>3</sub> ]				Достоверность, критерий Фридмана	Прирост по окончании эксперимента, см
	Степень увядания, баллы					
	День эксперимента					
	1-й	3-й	5-й	9-й		
Контроль	1 [1 ÷ 1]	1 [1 ÷ 1]	1 [1 ÷ 1]	1 [1 ÷ 1]	0,392	1,85 [1,3 ÷ 2,0]
Умеренная засуха	1 [1 ÷ 1]	1 [1 ÷ 1]	1 [1 ÷ 1]	1 [1 ÷ 2]	0,072	1,55 [1,2 ÷ 2,2]
Сильная засуха	1 [1 ÷ 1]	1,5* [1 ÷ 3]	3*# [1 ÷ 4]	3,5*# [2 ÷ 5]	0,00001	1,3 [1,0 ÷ 1,5]

Примечание: \* – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,017$ ), # – статистически значимые различия между экспериментальными группами (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,017$ )



и группа с умеренной засухой имели примерно одинаковый уровень транскрипционной активности *DREB2*, а у группы с сильной засухой он резко повысился в 1,96 раза по сравнению с 1-м днем и в 1,44 раза по сравнению с умеренной засухой ( $p = 0,017$  и  $p = 0,016$  соответственно). На 5-й день растения из обеих экспериментальных групп отреагировали снижением транскрипционной активности *DREB2* до уровня значений, полученных в 1-й день. В группе, где была смоделирована сильная засуха, на 5-й день эксперимента транскрипционная активность была значительно ниже по сравнению с контрольной ( $p = 0,008$ ). В последний день эксперимента у группы с сильной засухой уровень транскрипционной активности *DREB2* остался на том же уровне, а у группы с умеренной засухой снизился значимо по сравнению с контролем ( $p = 0,002$ ) до уровня растений, подвергнутых сильной засухе. Анализ транскрипционной активности *rbcL* у *R. pseudoacacia* выявил, что она практически не изменялась как у контрольной, так и у экспериментальных групп в ходе моделирования засухи (рисунок 2, Б).

Таким образом, семена *R. pseudoacacia* из группы сильная засуха имели наиболее ярко выраженное изменение транскрипционной активности *DREB2* в условиях моделируемой засухи по сравнению с остальными группами. В целом, на 3-й день растения при сильной засухе имели резкое повышение транскрипционной активности *DREB2* с последующим резким снижением. Такая же тенденция наблюдалась у растений из группы умеренная засуха: наиболее высокий уровень транскрипционной активности на третий день эксперимента с последующим снижением ниже уровня контроля. Исходя из полученных результатов можно предположить, что *DREB2* в первую очередь участвует в быстром ответе на засуху, что согласуется с работами, проведенными у *A. thaliana* [4, 11]. Возможно, в дальнейшем включаются другие механизмы ответа на стресс, из-за чего уровень экспрессии *DREB2* снижается [8].



**Рисунок 2 – Относительная экспрессия генов у *R. pseudoacacia* в условиях моделируемой засухи: А – *DREB2*; Б – *rbcL*. \* – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,017$ ), # – статистически значимые различия между экспериментальными группами (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,017$ ), & – статистически значимые различия внутри группы (критерий Вилкоксона,  $p < 0,017$ )**

**Figure 2 – Relative gene expression in *R. pseudoacacia* under simulated drought conditions: А – *DREB2*; Б – *rbcL*. \* – statistically significant differences compared to the control group (Mann-Whitney test,  $p < 0,017$ ), # – statistically significant differences between the experimental groups (Mann-Whitney test,  $p < 0,017$ ), & – statistically significant differences within the group (Wilcoxon test,  $p < 0,017$ )**

**Заключение.** В условиях умеренной засухи растения не демонстрировали выраженных признаков увядания, тогда как при сильной засухе увядание началось уже на 3-й день и значительно усилилось к 9-му дню. На 9-й день большая часть растений из группы сильная засуха имели сниженный тургор, волнистую поверхность листовых пластинок, изменение их угла наклона, пожелтение и засыхание части листьев.

Транскрипционная активность гена *DREB2* у *R. pseudoacacia* значительно изменяется в условиях засухи, демонстрируя повышение на 3-й день эксперимента с последующим снижением к концу эксперимента, особенно в условиях сильного водного дефицита. На 5-й день экспери-





мента наблюдалось снижение транскрипционной активности *DREB2* в обеих экспериментальных группах, одновременно с этим происходило ухудшение жизненного состояния растений. Так, в группе сильная засуха большая часть растений имела более выраженные признаки увядания (3–4 балла) по сравнению с предыдущими днями. Дальнейшее снижение транскрипционной активности этого гена приводило к еще большему завяданию. Транскрипционная активность *rbcL* оставалась стабильной при различной влажности почвы при моделировании засухи.

Результаты исследования расширяют представления об адаптации *R. pseudoacacia* к засухе на молекулярно-генетическом уровне, а также могут быть использованы при получении растений с улучшенными хозяйственно-ценными признаками методами классической селекции и геномной инженерии.

*Исследования проведены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FNFE-2025-0013 «Управление экспрессией генов, вовлеченных в процесс адаптации к неблагоприятным факторам внешней среды, для улучшения хозяйственно-ценных признаков древесно-кустарниковых и культурных растений, используемых в агролесомелиорации».*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Использование робинии лжеакация (*Robinia pseudoacacia* L.) для облесения техногенно нарушенных земель / Э. И. Трещевская [и др.] // Лесотехнический журнал. 2017. № 3 (27). С. 151–157. DOI: 10.12737/article\_59c2273cd022e3.42507886. [The use of *Robinia pseudoacacia* for afforestation of post-mining lands / E. I. Treshchevskaya et al. *Forestry Engineering Journal*. 2017;(3):151–157. (In Russ.). DOI: 10.12737/article\_59c2273cd022e3.42507886].
2. Манаенков А. С., Абакумова Л. И. Повышение эффективности полезащитного лесоразведения в острозасушливых районах России // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. 2015. № 4 (28). С. 73–83. [Manaenkov A. S., Abakumova L. I. Increase in efficiency of field-protective forestations in critical droughty regions of Russia. *Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest Ecology. Nature Management*. 2015;(4):73–83. (In Russ.)]
3. Элементы технологии размножения *Robinia pseudoacacia* L. для защитного лесоразведения в условиях деградации и опустынивания территорий / С. Н. Крючков [и др.] // Аридные экосистемы. 2023. № 1 (94). С. 96–104. DOI: 10.24412/1993-3916-2023-1-96-104. [Elements of the reproduction technology of *Robinia pseudoacacia* L. for protective afforestation under conditions of degradation and desertification of territories / S. N. Kryuchkov. *Arid Ecosystems*. 2023;(1):96–104. (In Russ.). DOI: 10.24412/1993-3916-2023-1-96-104].
4. Cellular phosphorylation signaling and gene expression in drought stress responses: ABA-dependent and ABA-independent regulatory systems / F. Soma et al. *Plants*. 2021;4(10):756. DOI: 10.3390/plants10040756.
5. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression / Y. Sakuma et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(49):18822–18827. DOI: 10.1073/pnas.0605639103.
6. Engelbrecht B. M. J., Kursar T. A. Comparative drought-resistance of seedlings of 28 species of co-occurring tropical woody plants. *Oecologia*. 2003;136:383–393. DOI: 10.1007/s00442-003-1290-8.
7. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression / Y. Sakuma et al. *The Plant Cell*. 2006;18(5):1292–1309. DOI: 10.1105/tpc.105.035881.
8. Genome-Wide Analysis of DREB Genes in Sugar Beet and Their Potential Functions in Response to Drought Stress / W. Qiu et al. *Sugar Tech*. 2024:1–17. DOI: 10.1007/s12355-023-01337-1.
9. Lata C., Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2011;62(14):4731–4748. DOI: 10.1093/jxb/err210.
10. Livak, K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Method*. 2001;25(4):402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
11. Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration-and high-salinity-responsive gene expression / K. Nakashima et al. *Plant Molecular Biology*. 2000;42:657–665. DOI: 10.1023/A:1006321900483.
12. Plant photosynthetic responses under drought stress: Effects and management / N. Zahra et al. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2023;209(5):651–672. DOI: 10.1111/jac.12652.
13. Singh J., Thakur J. K. Photosynthesis and abiotic stress in plants. *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. 2018:27–46. DOI: 10.1007/978-981-10-9029-5\_2.
14. The lectin gene TRpL1 of tetraploid *Robinia pseudoacacia* L. response to salt stress / S. Liu et al. *Journal of Forestry Research*. 2023;34(2):497–505. DOI: 10.1007/s11676-022-01479-0.
15. Tretyakova A.V., Zybinskaya P. A., Krylov P. A. Selection of reference genes for gene expression analysis by RT-qPCR in *Robinia pseudoacacia* L. under drought conditions. *Scientific Agronomy Journal*. 2024;(4):43–47. DOI: 10.34736/FNC.2024.127.4.006.43-47.

*Статья поступила в редакцию 28.02.2025; одобрена после рецензирования 15.04.2025; принята к публикации 29.04.2025. The article was submitted 28.02.2025; approved after reviewing 15.04.2025; accepted for publication 29.04.2025.*