

Zvyšování výnosu pšenice a hodnocení balance energie s využitím spalné kalorimetrie

(Increasing wheat yield and evaluation of energy balance using combustion calorimetry)

Hnilička, F.¹, Martinek², P., Hniličková, H.¹

¹ Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

² Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, Kroměříž

Souhrn: Jsou uvedeny změny odrůd pšenice v průběhu let ve vztahu k růstu výnosu. Potřeba zvyšování sklizňového indexu při zachování délky stébla vedla ke zvyšování hmotnosti zrna klasu. Je diskutována možnost dalšího zvyšování hmotnosti zrna klasu pšenice pomocí změn morfologické struktury klasu (nadpočetné klásky, dlouhá pleva). Je naznačena možnost využití spalné kalorimetrie pro studium rozložení energie v porostu. Stanovení hmotnosti biomasy rostlin a jejího energetického ekvivalentu je důležité pro posouzení produkční schopnosti pšenice nejen v optimálních, ale i stresových podmínkách.

Klíčová slova: pšenice, odrůda, výnosový potenciál, šlechtitelský vývoj, porost, energie, kalorimetrie

Abstract: Changes in wheat varieties over the years in relation to yield growth are shown. The need to increase the harvest index while maintaining the length of stem led to an increase kernel weight per spike. The possibility of further increasing the spike grain weight through changes its morphological structure (supernumerary spikelets, long glume) is discussed. The possibility of using combustion calorimetry to study the energy distribution during the plant growth is indicated. Evaluation of the plant weight biomass and its energy equivalent is an important indicator of wheat production potential not only in optimal but also in stressful conditions.

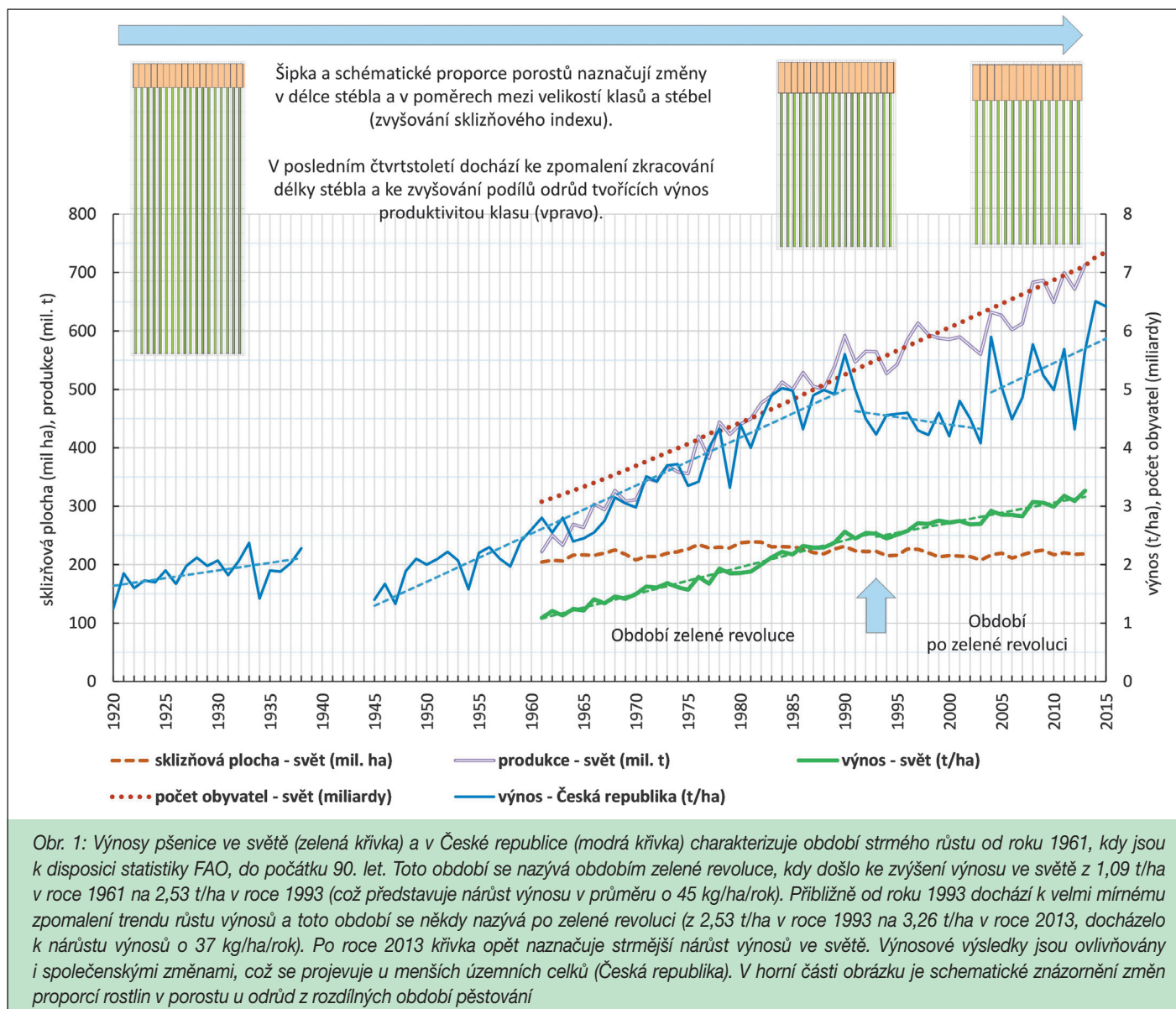
Key Words: wheat, variety, yield potential, breeding development, stand, energy, calorimetry

Zabezpečení zdrojů pro lidskou populaci závisí také na stavu zemědělství a jeho schopnosti stabilně produkovat dostatek potravin. Vzhledem k enormnímu zatěžování prostředí by mělo dojít k preferenci činností nezbytných pro udržitelné a důstojné zabezpečení existence lidí. Kromě zdrojů zajišťujících úrodnost a technologii zpracování půdy je potřeba vyvíjet odrůdy plodin s vysokým výnosovým potenciálem. Zvláště nevyhnutelné to je v podmínkách s výrazným úbytkem zemědělské půdy, kdy intenzivní technologie by měly nahradit tento úbytek. Podle definice je výnosový potenciál (schopnost) definován jako výnos odrůdy pěstované v prostředí, na které je adaptována, za optimálních podmínek, bez nedostatku živin, vody, bez výskytu škůdců a chorob, poléhání a plevelů, které jsou pod účinnou kontrolou (Evans a Fischer, 1999). Logicky je relativně méně náročné vytvářet odrůdy, které by vyhovovaly výše uvedené definici, oproti zajišťování energetických vstupů do prostředí, které by měly umožnit maximální realizaci výnosového potenciálu. V současnosti máme k dispozici odrůdy, které jsou výsledkem domestikace a následně cílevědomého intenzivního šlechtitelského působení (obr. 1). Odrůda v současnosti představuje obvykle linii, tedy soubor geneticky shodných jedinců, jejichž genetický základ je určující pro výnosový potenciál. Proto hovoříme o genetickém výnosovém potenciálu, který se v konkrétním prostředí (dané úrodností půdy, průběhem počasí a úrovní pěstitelských technologií) realizuje jen z části prostřednictvím výnosu. Je to dáno tím, že obvykle nejsme schopni zabezpečit ideální podmínky pěstování, které obvykle ani zcela neznáme. Ve společnosti, která je orientována na co nejvyšší ekonomický zisk, mají odrůdy co nejefektivněji realizovat maximum svého výnosového potenciálu při zachování požadované kvality produkce v reálném prostředí za použití vhodných pěstitelských technologií.

Biomasa a sklizňový index

Odrůdy pšenice, pěstební technologie a podmínky dané úrodností půdy a počasím mají umožnit maximální produkci biomasy porostu z jednotky plochy tak, aby současně co nejvyšší podíl této biomasy připadal na výnos zrna. Jedná se tedy o maximalizaci sklizňového indexu (HI), který představuje poměr mezi hmotností zrna a hmotností nadzemní biomasy. U současných odrůd pšenice se obvykle pohybují hodnoty HI v rozmezí 0,4–0,5. Z pokusů porovnávajících odrůdy z různých období pěstování plyne, že šlechtitelská činnost vedla ke značným změnám habitu rostlin, který se nejvýrazněji projevil ve zkracování délky stébla, což ve svém důsledku vedlo nejen ke zlepšení odolnosti k poléhání, ale ke zvýšení hmotnosti zrna klasu – tedy ke zvýšení HI. Zajímavé je, že rozdíly mezi starými a novými odrůdami se nevyznačují podstatnými rozdíly v sušině nadzemní biomasy porostu na jednotku jeho plochy. To dokumentuje, že šlechtitelskou činností se nedařilo zásadně zlepšovat efektivitu fotosyntézy porostu. Z dlouhodobého pohledu šlechtění ovlivnilo výrazně proporce mezi klasem a stéblem. Zajímavé ale je, že zhruba v posledním čtvrtstoletí lze pozorovat zpomalení až zastavení trendu zkracování délky stébla, což lze dokumentovat na malém až žádném délkovém rozdílu mezi souborem odrůd pěstovaných zhruba před 30 lety a odrůdami současnými. Tento jev není náhodný. Lze se domnívat, že délka stébla u současných odrůd zřejmě dosáhla ekologického limitu, který naznačuje, že další výraznější zkracování délky stébla by vedlo ke zhoršení odolnosti porostů vůči abiotickým stresům, mezi něž patří především sucha. Také je zcela logické, že nelze zkracovat délku stébla do nekonečna.

V České republice je výsledné počasí ovlivňováno prolínáním vlivu přímořského a kontinentálního klimatu, proto pokračování ve výrazném zkracování délky stébla odrůd by se nejspíš proje-



vilo poklesem stability výnosů. Přestože další zkracování délky stébla je geneticky možné, v současnosti se jeví spíše jako nežádoucí. Toto zjištění nachází podporu například v práci Lejšová-Svobodová et al. (2020), kde byly porovnávány rozdíly mezi skupinami odrůd pěstovaných na našem území v různých obdobích pěstování. Odrůdy pocházející ze stabilnějšího přímořského klimatu s vyššími sumami srážek (například z Francie a Anglie) jsou často ještě o něco kratší než současné naše odrůdy.

Tvorba výnosu

Výnos zrna je tvořen násobkem počtu klasů z jednotky plochy, počtu zrn klasu a průměrnou hmotností jednoho zrna. V podmínkách střední a západní Evropy je pozorován trend zvyšování počtu odrůd tvořících výnos zvýšenou hmotností zrna klasu (klasové typy odrůd) při středním nebo nižším počtu klasů, zatímco četnost odrůd tvořících výnos vysokým počtem klasů (hustotní typy odrůd) s malou produktivitou klasu se snižuje (Bezdičková a Kryštof, 2010). Příčinou tohoto trendu je nižší odolnost k poléhání hustých porostů s klasy na ohebných tenkých stéblech, a i snadnější možnost zvyšování hmotnosti zrna klasu v řidších porostech s nižším počtem klasů

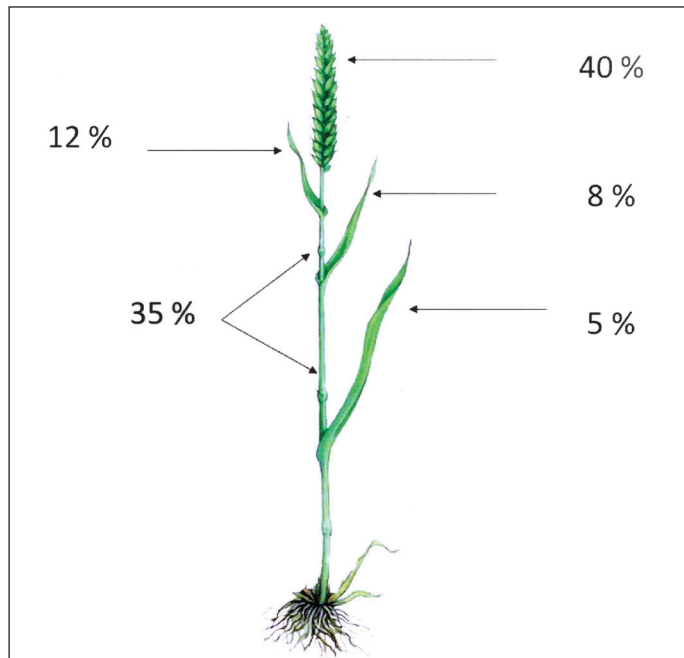
na jednotku plochy porostu. Ovlivňování hustoty porostu lze dosáhnout dokonalejšími secími stroji s možností přesnějšího a rovnoměrnějšího výsevu. Po vyklíčení rostou rostliny zprvu jako solitéry, s postupujícím dalším růstem vyplňují svůj životní prostor a dostávají se do stavu, kdy se začnou navzájem dotýkat a posléze konkurovat svými orgány. Postupně dochází k zapojení porostu, kdy je dostupný prostor zcela vyplněn rostlinami.

Možnost tvorby biomasy porostu pak plně závisí na nosné kapacitě prostředí, dané především úrodností půdy, kterou můžeme ovlivňovat hnojením a pěstebními technologiemi. Celková hmotnost rostlin (jedinců) v porostu se může zvyšovat jen do určitého počtu rostlin na jednotce plochy porostu, při jeho překročení dochází ke konkurenci mezi rostlinami o omezené zdroje výživy a prostoru. V těchto podmínkách se další zvyšování počtu rostlin projevuje snižováním průměrné hmotnosti biomasy rostliny, takže celková hmotnost biomasy z jednotky plochy porostu zůstane nezměněna. Tato závislost byla nazvána zákon o konstantním konečném výnosu porostu (Slavíková, 1982; Russell et al., 1989) a limitující pro ni je nosná kapacita prostředí. Představa nekonečného růstu výnosu z plochy je mylná. Velikost výnosu je určována dostupností energie v prostředí, jejím využitím ve fotosyntéze a odpovídá plně zákonům termodynamiky.

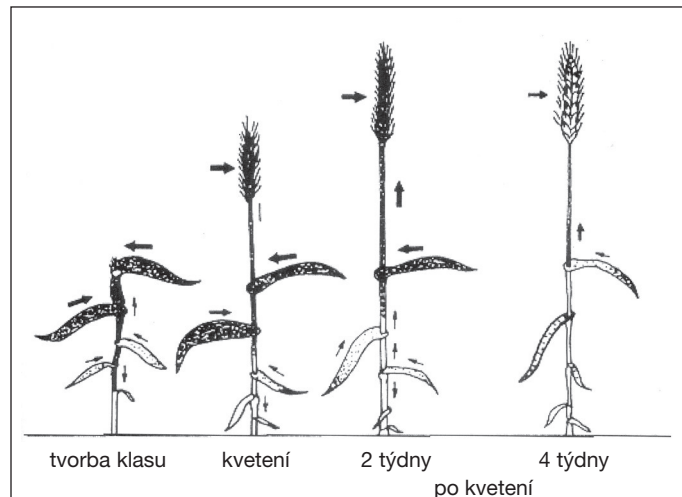
Fotosyntéza probíhá s různou intenzitou v rozdílných orgánech rostliny, jejichž velikost se v průběhu růstu rovněž mění (obr. 2), přitom její intenzita v průměru kulminuje ve fázi metání (BBCH 51) až kvetení (BBCH 69).

Transport asimilátů v rámci jednotlivých rostlinných orgánů probíhá rozdílnými směry (obr. 3), oproti tomu nárůst sušiny nadzemní biomasy rostliny pšenice trvá až do raně voskové zralosti (obr. 4), přičemž následuje během dozrávání intenzivní přesun asimilátů do zrna. Rychlost fotosyntézy a s ní spojená

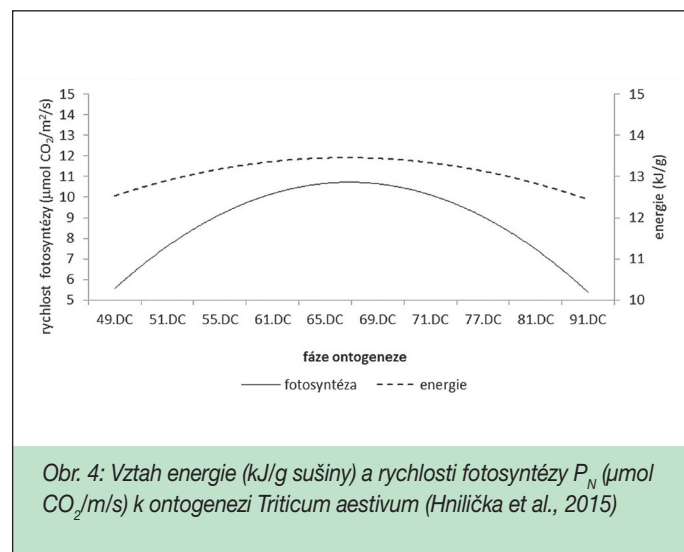
tvorba energeticky bohatých látek narůstá až do fáze konce kvetení – fáze 69 podle Zadokse (= BBCH 69). Následně vlivem senescence listů a transportu asimilátů do generativních orgánů (obílek) dochází k poklesu obsahu energeticky bohatých látek v sušině rostliny. Uvedený vztah mezi rychlostí fotosyntézy listů a obsahem energie velmi silně navzájem koreluje 0,93*** (obr. 5). Závislost mezi fotosyntézou a tvorbou energeticky bohatých látek je dynamický proces a jedná se o otevřený systém ovlivňovaný řadou nejrůznějších vlivů.



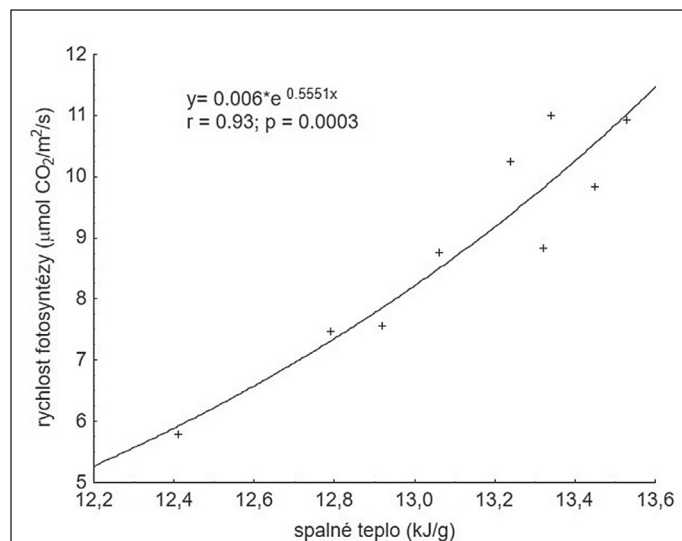
Obr. 2: Vliv jednotlivých částí rostlin na tvorbu asimilátů. Rychlost fotosyntézy není v rámci rostliny stejná, liší se mezi jednotlivými orgány, ale také vývojovou fází, kdy klas včetně osin vytvoří až 40 %, horní internodium, stéblo 35 %, čepel a pochva praporcového list 12 % a druhého listu shora 8 % a spodní část rostliny zbývající 5 % asimilátů (upraveno dle Petr, 2001)



Obr. 3: Transport asimilátů v rámci rostlinného těla v rámci generativní fáze. Pohyb asimilátů je naznačen šipkami, přičemž množství transportovaných látek je znázorněno silou dané šipky. Z toho je patrné, že spodní listy zajišťují tvorbu asimilátů a jejich transport do spodních částí rostlin a do kořenů, kdežto horní část se především podílí na transportu asimilátů do vznikajících obílek. Transport asimilátů je tokem obousměrným a jeho směr závisí na koncentračním spádu a „požadavcích“ rostoucích či zásobních orgánů. Čím tmavší barvou je daný orgán vybarven tím více asimilátů se v něm tvoří. Světlejší barvou je vyznačena nižší rychlost fotosyntézy, a tedy i tvorba asimilátů (upraveno dle Larcher, 1995)



Obr. 4: Vztah energie (kJ/g sušiny) a rychlosti fotosyntézy P_N ($\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$) k ontogenezi *Triticum aestivum* (Hnilička et al., 2015)



Obr. 5: Exponenciální závislost mezi energií listů (kJ/g sušiny) a rychlostí fotosyntézy P_N ($\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$) u *Triticum aestivum* podle Hniličky et al. (2010)

Zajímavé je, že i při zpomalení nebo zastavení zkracování délky stébla odrůd během posledního čtvrtstoletí (jak bylo řečeno výše) celosvětový růst výnosů pšenice pokračoval téměř nezměněně i nadále a poměrně plynule navazoval na období, kdy zkracování délky odrůd bylo ještě markantní. Vývoj výnosů odrůd pšenice naznačuje, že vyšší výnos může být dosahován snadněji, pokud v zrna je vyšší podíl polysacharidů (škrobů) a nižší podíl bílkovin. Vyplyvá to také z výsledků ÚKZÚZ, kde odrůdy s potravinářskou kvalitou (E a A) mají v průměru vyšší obsah bílkovin v zrna a zároveň poněkud nižší výnosy, zatímco u odrůd s nepotravinářskou kvalitou C tomu bývá naopak. Může to souviset s rozdílem v množství metabolické energie, kterou rostlina vynakládá na syntézu jednotkového množství bílkovin a škrobu v zrna. Starší odrůdy se obvykle vyznačovaly vyšším obsahem bílkovin v zrna. Je možné, že na tyto vztahy bylo nutné reagovat i úpravou normy pro potravinářskou pšenici ČSN 46 1100-2 v ČR v roce 2001, kdy došlo ke snížení minimální hodnoty obsahu bílkovin v zrna pro výkup potravinářské pšenice z původních 12,5 % na 11,5 %. V již zmiňované práci Lejšové-Svobodové et al. (2020) je dokumentováno, že výnosnější genotypy z poslední doby se vyznačují nižším obsahem bílkovin a vyšším obsahem škrobu než odrůdy z doby před 30 lety.

Vyšší výnosová schopnost současných odrůd je doprovázena vyšším podílem škrobu v zrna, jejichž biosyntéza zřejmě vyžaduje menší množství metabolické energie než syntéza bílkovin. K pozvolnému trendu snižování obsahu bílkovin v zrna mohl rovněž přispívat vzestup koncentrace CO₂ v atmosféře v souvislosti s trendem globálního oteplování (Nátr, 2000; Tian et al., 2015). Obecný trend zvyšování výnosů prostřednictvím zvyšování hmotnosti zrna v klasu při zastavení trendu zkracování délky stébla je doprovázeno stagnací počtu klasů na jednotce plochy, případně i snižováním tohoto počtu. Otázkou je, kdy dojde k vyčerpání těchto do značné míry obecných trendů a zda je možné na ně nějak cíleně navázat například cíleným využitím genů ovlivňujících morfologii klasu a v něm zvýšený počet klásků a kvítků.

Nadpočetné orgány

Trávy obecně, a tedy i obilniny, mají vlastní strategii přizpůsobivosti se změnám prostředí díky své modulární struktuře vytvářených orgánů. Klasický morfotyp pšenice reaguje v průběhu času na změny dostupnosti zdrojů obvykle pomocí tří úrovní větvení, představujících hierarchické struktury: 1. odnože v odnožovacím uzlu, 2. klásky v klasu, 3. zrna v kláscích. V těchto uzlech rostlina zakládá zvýšený počet orgánů, které lze pokládat za nadpočetné, z nichž se do doby zrlosti realizuje jen část. Během růstu rostlina reaguje na změny prostředí a dostupnost zdrojů redukcí těchto nadpočetných orgánů. Hierarchická organizace rostlin současně zajišťuje rozmnožování rostlin, a to i v nepříznivých podmínkách.

U standardního morfotypu klasu jsou kvítky v terminální (vrcholové) části obvykle nevyvinuté a jsou sterilní. Zrna se vyvíjejí v postranních kvítcích klásku. Do období zrlosti dochází postupně k redukci, takže ve zrlosti pouze některé kvítky v kláscích mají zrna. Standardní morfotyp klasu má tedy ještě své rezervy spočívající v omezení míry redukce fertility kvítků, což se často u současných odrůd projevuje schopností zvyšovat vyšší počet zrn v kláscích.

U pšenice byl v poslední době zaznamenán značný pokrok ve výzkumu morfologické struktury klasu. Především se jedná o skupinu genů řídících výskyt tak zvaných nadpočetných klásků klasu (supernumerary spikelets), kde na rozdíl od běžné pšenice může vyrůst více než jeden klásek z jednoho nodu klasového větve. V Kroměříži byly šlechtitelsky rozpracovány linie se změněnými morfotypy klasu (obr. 6), které mohou mít naději na šlechtitelské využití. Jedná se o:

Mnohořadý klas (multi-row spike - MRS)

V Kroměříži se zabývají tak zvaným mnohořadým klasem, kdy z jednotlivých nodů klasového větve vyrůstá vyšší počet klásků přisedle v horizontální a současně i vertikální pozici, přičemž nejsou výrazně prodlouženy druhotné větve klasu. Mnohořadý klas je u pšenice seté podmíněn recesivním genem *WFZP-D* (*Wheat Frizzy Panicle*) na krátkém rameni chromosomu 2D. Tento gen je obdobný jiným genům *Frizzy Panicle* (FZP), řídícím větvení květenství u vyšších rostlin. U pšenice byly identifikovány homeologické geny (*WFZP-A*, *WFZP-B* a *WFZP-D*), řídící větvení klasu na různé úrovni ploidie. Zvýšený počet klásků u mnohořadého klasu by mohl přispět ke zvýšení reprodukční kapacity klasu (počtu zrn klasu) a působit například analogicky jak to známe u ozimého šestiřadého a ozimého dvouřadého ječmene, kdy odrůdy šestiřadého ječmene bývají v průměru o něco výnosnější než odrůdy dvouřadé.

Dlouhá pleva (long glume - LG)

Znak dlouhá pleva se vyskytuje u dvou tetraploidních druhů *Triticum polonicum* L. (gen *P1* na chromosomu 7A) a *T. ispahanicum* Hesolt. (gen *P2* na chromosomu 7B) a rovněž u hexaploidní *T. petropavlovskyi* Udac. & Migusch. Domníváme se, že dlouhá pleva představuje evoluční výhodu spočívající v dosažení větších obiliek vzhledem k většímu asimilačnímu povrchu klasu. Pracujeme s dominantním genem pro dlouhou plevu, který byl přenesen do pšenice seté z *T. polonicum*. Předpokládáme, že dlouhá pleva by svým větším povrchem mohla podporovat asimilační kapacitu klasu a zřejmě i transpiraci rostliny. Tím by mohla pozitivně působit na tvorbu obilek i v období na konci dozrávání.

Využití spalné kalorimetrie pro měření fotosyntézy

Vedle gazometrických metod měření rychlosti fotosyntézy je možné transport asimilátů a vztah mezi sink (místo spotřeby či akumulace) a source (zdroj asimilátů) měřit pomocí spalné kalorimetrie umožňující měřit obsah energie v rostlinné biomase, a i v některých sloučeninách vzniklých během fotosyntézy. Na základě toho lze určovat míru a efektivitu ukládání energie v rostlinách, míru ovlivnění rostlin okolními podmínkami a údaje týkající se růstu rostlin a jejich částí.

Při hodnocení obsahu energie v rostlinné biomase a v rámci jejich translokace mezi listy a generativními orgány je nutné si uvědomit, že rostliny jsou z energetického pohledu systémy otevřené a jsou závislé na externích zdrojích energie. Rozdíl v míře fotosyntézy a dýchání má zásadní vliv na energetickou bilanci rostlin. Jsou-li tyto hodnoty vyrovnané, rostlina se nachází v energetické rovnováze. Převyšuje-li míra dýchání (respirace) míru fotosyntézy, hmota rostliny je spotřebovávána a tím dochází ke ztrátě asimilátů a následnému snížení výnosu, včetně jeho kvality. V opačném případě dochází k vytváření biomasy, tedy organické hmoty rostlin, která může být využita k vyššímu transportu asimilátů do vyvíjejícího se klasu a tím ovlivňovat počet obilek, jejich hmotnost a kvalitu ukládaných zásobních látek v zrna.

Obsah energie v rostlině je v různých pletivech rostliny různý a pochopitelně záleží rovněž na obsahu vody v pletivu. Obsah energie ve vegetativních orgánech je v porovnání s orgány generativními relativně stabilní a nižší. Vysoký energetický obsah v generativních orgánech rostlin je tedy dán transportem energeticky bohatých látek do těchto orgánů a jejich přeměnou na zásobní látky.

Spalná kalorimetrie dokáže popsat změny v nahromadění asimilovaných živin a jejich přesun v rámci rostliny i popisovat fotosyntetickou aktivitu rostliny za pomoci měření změn obsahu energie v nich a zjišťovat zdroje (source) a místa uskladnění energie (sink). Díky spalné kalorimetrii byl například odhalen vztah mezi akumulací látek s vysokým energetickým obsahem a vytvářením organické hmoty rostliny během jejího vývoje. Energie naměřená spálením biologického vzorku spalnou kalorimetrií nepopisuje energii biologicky dostupnou pro rostlinu samotnou, ani energii pro případnou spotřebu a využití v potravinářském průmyslu. Spáleny jsou totiž i složky nestravitelné, které se vyznačují velkými molekulami. Tyto představují například strukturní sacharidy a podobné látky. Spalná kalorimetrie by mohla odhalit energii kumulovanou v bílkovinné a polysacharidové složce sklizeného zrna. Užitečné by bylo zvýšit výkonnost fotosyntézy například zlepšenou fotosyntetickou fixací CO_2 . Mohlo by být velmi užitečné výzkum orientovat tímto směrem, a to i přes současný negativní postoj k využívání genetických modifikací.



Závěr

Zvyšování výnosové schopnosti odrůd pšenice bylo doprovázeno hlavně morfologickými změnami proporcí rostlin. Ty se projevily hlavně ve zvyšování hmotnosti zrna klasu a ve zkracování délky stébla. Během posledních přibližně 30 let je u odrůd pozorován trend zpomalení zkracování délky stébla, což má pravděpodobně příčinu v nezbytnosti zachování přijatelné míry adaptace na stávající klimatické podmínky prostředí, kdy odrůdy s příliš krátkým stéblem by se nemusely dobře vyrovnávat se stresem prostředí. V poslední době se zvyšování výnosů uskutečňuje prostřednictvím zvyšování hmotnosti zrna klasů, které vyrůstají na pevnějších stéblech. Umožňuje to také využití pokročilých pěstitelských technologií, schopných upravit porost při středním nebo nižším počtu klasů na jednotce plochy porostu. Současně je pozorován trend snižování obsahu bílkovin v zrnu. Je diskutována možnost navázání na tento trend vývoje také cíleným využitím forem umožňujících tvorbu nadpočetných klásků v klasu (mnohořadý klas), případně zvětšení asimilačního povrchu květních obalů (dlouhá pleva). Pro studium využití energie rostlinami v porostu a míry ukládání energie v zásobních látkách zrna (bílkoviny, škroby) může být použita metoda spalné kalorimetrie.

Příspěvek byl podpořen projektem MZe ČR QK1910343.
/Recenzováno/

Literatura:

- Bezdičková, J., Kryštof, Z. 2010: Nový pohled na tvorbu výnosu ozimé pšenice Agromanual: Profesionální ochrana rostlin, 5(4), 44–45.
- Evans, L.T., Fischer, R.A. 1999: Yield potential its definition, measurement, and significance. Crop Sci., 39(6), 1544–1551.

- Hnilička, F., Hniličková, H., Martinková, J. 2010: Využití metod spalné kalorimetrie v biologických vědních disciplínách. Bláha L. (ed.) In. Současné možnosti fyziologie a zemědělského výzkumu přispět k produkci rostlin (vybrané kapitoly). Power Print Praha, 235–255.
- Hnilička, F., Hniličková, H., Hejnák, V. 2015: Use of combustion methods for calorimetry in the applied physiology of plants. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 120 (1), 411–417.
- Nátr, L. 2000: Koncentrace CO_2 a rostliny (CO_2 concentration and plants). ISV publishing house, Praha, 257 pp., ISBN 80-85866-62-5.
- Larcher, W. 1995: Physiological Plant ecology. Berlin, Heidelberg & New York. 513 pp.
- Leiřová-Svobodová, L., Chrpová, J., Hermuth, J., Dotlačil, L. 2020: Quo vadis wheat breeding: a case study in Central Europe. Euphytica, № 9 <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02670-2>
- Petr, J. 2001: Pěstování Pšenice podle užitkových směrů. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 40 s.
- Russell, G., Marshall, B., Jarvis, P.G. (EDS) 1989: Plant canopies: their growth, form and function, Cambridge University Press, 179p.
- Slavíková, J. 1982: Ekologie rostlin, Univerzita Karlova, Praha, 247p.
- Tian, Y.L., Zheng, C.Y., Chen, J., Chen, C.Q., Deng, A.X., Song, Z.W., Zhang, B.M., Zhang, W.J. 2015: Climatic warming increases winter wheat yield but reduces grain nitrogen concentration in East China. Plos One, 9(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0095108