

Hybridní zóny a „záhada záhad“ Studium hybridních zón a otázka vzniku druhů

Miloš Macholán, Pavel Munclinger

„I učinil Bůh zvěř zemskou podle pokolení jejího,
též bovada podle pokolení jejích, i všeliký zeměplaz podle pokolení jeho.
A viděl Bůh, že to bylo dobré.“

(Gen.1.21,25)

„Ta záhada záhad, nabrizení vyhynulých druhů jinými.“
(J. W. F. Herschel, dopis Ch. Lyellovi, 20. února 1836)

I pro běžného laika je existence druhů očividná, stačí se v zimě podívat na ptačí krmítko: málokdo by měl asi problém rozlišit vrabce od sýkory nebo kosa. Půjdeme-li v létě po polní cestě, rozeznáme podél ní divizny, sedmikrásky či vlčí mák. Samozřejmě, v mnoha případech bychom tak snadnou práci s rozlišením druhů neměli, přesto s námi bude asi většina čtenářů souhlasit, že druhy skutečně reálně existují. Proč by ale měly? Proč podél naší cesty kromě divizen a sedmikrásek nevidíme i různé kombinace obou rostlin, jakési „divikrásky“? Pokud zavrhneme prosté vysvětlení nadpřirozeným zásahem shůry, zjistíme, že odpověď na tuto otázku není zdaleka triviální.

Jestliže mají divizny zůstat diviznami a sedmikrásky sedmikráskami, musí existovat nějaké mechanismy, které buď zabrání jejich vzájemnému křížení, nebo způsobí, že potomci vzniklí z jejich mesaliance budou určitým způsobem penalizováni (např. snížením jejich životaschopnosti nebo plodnosti). Přitom můžeme s jistotou předpokládat, že kdysi v dávné minulosti měly divizny a sedmikrásky společné předky, můžeme jim říkat třeba „protodivikrásky“, přičemž mezi jednotlivými protodivikráskami probíhala volná výměna genetického materiálu. Jak se stalo, že se rostliny z jedné populace protodivikrásek přestaly množit s jinými populacemi téhož druhu? Možných vysvětlení je několik, nejpravděpodobnější scénář mohl být asi takový: Následkem geologických procesů byla kdysi jednotná populace rozdělena na dvě části (řekou, pohořím, oddělením kontinentálních desek apod.), takže mezi protodivikráskami z obou takto vzniklých populací (můžeme si je

označit třeba A a B) už nemohlo docházet ke vzájemné genetické výměně. Geografická bariéra způsobila, že se jak v populaci A, tak i B postupně kumulovaly genetické rozdíly, a jestliže tato izolace trvala dostatečně dlouho, nabyly rozdíly takového rozsahu, že po opětovném setkání příslušníků obou populací už jejich křížení bylo problematické, nebo nebylo možné vůbec. Potomci protodivikrásek A se vydali svou vlastní evoluční cestou až ke dnešním sedmikráskám, z potomků protodivikrásek B vznikly divizny.

Až potom se zdá výše uvedený scénář poměrně jednoduchý, je to ovšem tím, že jsme dosud zůstali jen na povrchu celého problému. Evoluční biologie zabývající se vznikem nových druhů (speciací) zajímá především podstata bariéry mezi dvěma reprodukčně izolovanými populacemi. Lze si představit řadu možných mechanismů od prostorového či sezonního oddělení populací přes preference partnerů stejného

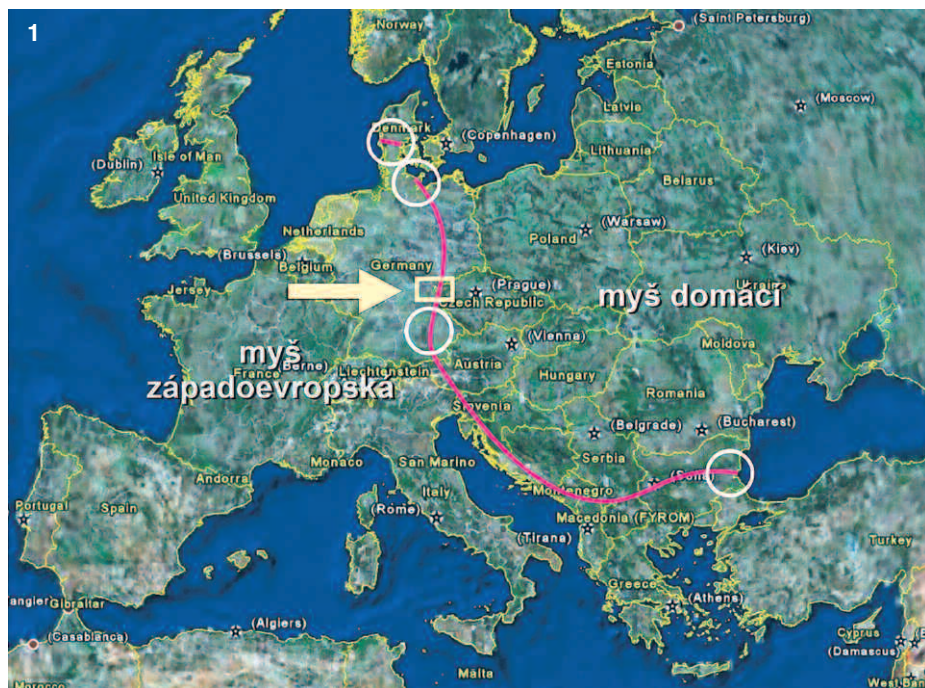


druhu až po problémy nastávající po oplodnění vajíčka. Protože v tomto případě nepatří za vším hledej ženu, ale za vším hledej geny, musíme si položit několik klíčových otázek: Kolik genů způsobuje reprodukční izolaci a jak velký mají účinek? Interagují tyto geny vzájemně při vzniku reprodukční bariéry a jestliže ano, jakým způsobem? Jsou za tyto bariéry odpovědné libovolné geny, nebo pouze geny se specifickou funkcí? Stojí za evoluci těchto genů přírodní výběr, nebo náhodné procesy?

Studium současných sedmikrásek a divizen nám k zodpovězení těchto otázek bohužel moc nepomůže. Mezi oběma druhy se totiž během dlouhé doby vyvinulo tolik rozdílů, že už nelze říci, které z nich byly zásadní pro vznik reprodukční bariéry a které vznikly až v důsledku této izolace. Proto je třeba se zaměřit na druhy ve stadiu zrodu, tedy na populace, mezi nimiž je reprodukční bariéra dosud nedokonalá. Příslušníky takových populací můžeme za jasně definovaných podmínek zkřížit v laboratoři a zkoumat následky této experimentální hybridizace. V ideálním případě se podaří dospět až ke konkrétním genům, které mají na svědomí sterilitu nebo vývojové vady hybridů. Některé z těchto genů, často označovaných jako „speciální“, už byly skutečně identifikovány, zatím ovšem jen u velmi omezeného počtu organismů.

Pravděpodobně neznámější speciální gen byl objeven u populárního modelového živočicha, octomilky rodu *Drosophila* (tzv. banánové mušky). Přestože název tohoto genu — Odysseus (*Ods*) — může pro někoho znít docela poeticky, skutečnost je mnohem prozaičtější. Stejně jako bájný řecký hrdina, který se svými spolubojovníky lstí vnikl do nedobytné Tróje ukryt v útrohách dřevěného koně, aby pak v noci otevřel brány a pobil spící nepřátele, i gen Odysseus, jakmile se ocitne v cizím genomu, vyvolává vážné problémy. Proto neboží

Obr. 1 Satelitní snímek Evropy s vyznačeným průběhem hybridní zóny (červená čára) mezi myši domácí — *Mus (musculus) musculus* a myši západoevropskou — *M. (musculus) domesticus*. Bílé kroužky označují oblasti, ve kterých byla tato zóna intenzivně studována, žlutým obdélníkem je vyznačena část zóny zasahující na naše území. Orig. M. Macholán





Obr. 2 Dvě formy myši, které se vzhledem k jejich synantropnímu způsobu života obecně označují jako „domácí“, přestože jsou známy oblastí, kde žijí zcela nezávisle na člověku. Myš domácí — *Mus (musculus) musculus* (vpravo) má světlejší hřbetní a především břišní stranu těla a o něco kratší ocas. Její areál sahá od střední a severní Evropy až po Dálný východ. Zbarvení myši západoevropské — *M. (musculus) domesticus* (vlevo) je proměnlivější, v mírném pásmu je však zpravidla výrazně tmavší, bez zřetelného rozdílu mezi hřbetní a břišní stranou. Vyskytuje se v západní a jižní Evropě a na Středním východě, díky vazbě na člověka však dokázala osídlit i Severní a Jižní Ameriku, Afriku a Austrálii. Foto B. Bímová, P. Munc-linger, M. Macholán

samci octomilek druhu *D. simulans*, kterým vědci pomocí důmyslných křížení zabudovali do genomu variantu *Ods* typickou pro příbuzný druh *D. mauritiana*, byli zcela sterilní (a z genetického hlediska tedy vlastně mrtví). Podobně jako antický rek i gen Odysseus urazil na své evoluční pouti velmi dlouhou cestu a jeho varianty vyskytující se u obou zmíněných druhů octomilek se liší natolik, že jejich přítomnost v genomu opačného druhu dělá z hybridních samců neplodné eunuchy.

Postup založený na kříženích v laboratoři je však zpravidla nákladný a technicky náročný. Naštěstí nám příroda nabízí jinou alternativu, ve které všechny experimenty vykonala za nás. Jde o tzv. hybridní zóny, tedy geografické oblasti, ve kterých se dvě geneticky odlišné populace setkávají, kříží a vzniká hybridní potomstvo. Oproti laboratorním pokusům mají hybridní zóny několik výhod. Kromě mnohem menší technické náročnosti a nižších finančních nákladů je to např. skutečnost, že v těchto oblastech probíhá hybridizace po mnoho generací a navíc veškeré potomstvo vzešlé z tohoto křížení podléhá přírodnímu výběru, který lze v laboratorních podmínkách jen obtížně simulovat. Proto jsou hybridní zóny často vzletně označovány za „přírodní laboratoře“ či „okna do evoluce“.

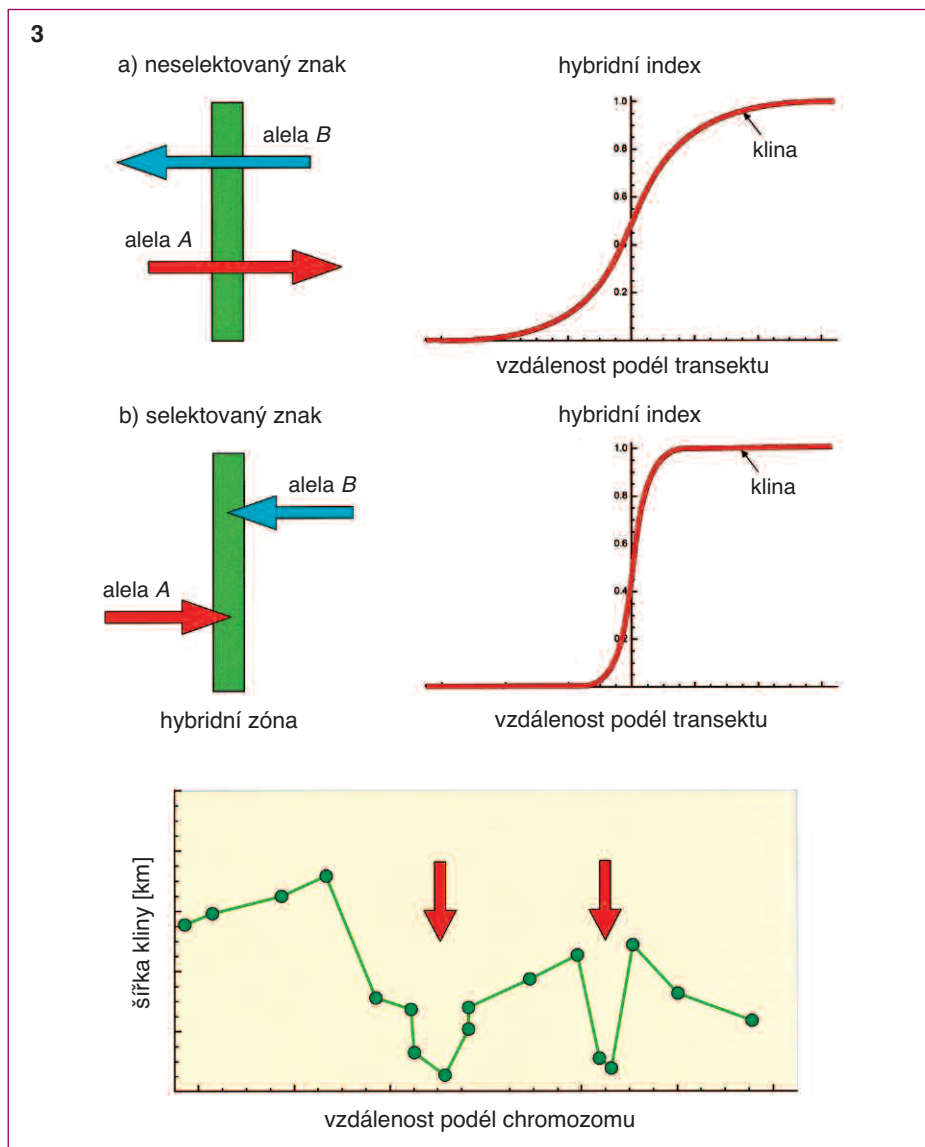
Hybridizace byla studována u celé řady organismů od rostlin až po obratlovce. Jedním z modelových druhů, které se k tomuto účelu ideálně hodí, je myš domácí. Jednak zpravidla není příliš obtížné získat dostatečné množství studijního materiálu, jednak v případě potřeby lze myši snadno chovat a rozmnožovat v zajetí. Navíc známe téměř kompletní sekvenci myšího genomu a máme k dispozici několik desítek tisíc vhodných molekulárních znaků, které lze použít k různým typům genetických analýz. Z našeho hlediska není zanedbatelná ani skutečnost, že jedna z myších hybridních zón se nachází v Evropě a dokonce zasahuje i na území České republiky. Tento asi 2 500 km dlouhý a přibližně 20 km široký pás hybridních populací protíná Jutský poloostrov a od pobřeží Baltského moře prochází střední Evropou přes Balkán až k Černému moři (obr. 1). Pokračování této zóny můžeme najít v Zakavkazí, tam je však mnohem méně probá-

daná. Odděluje areály výskytu dvou synantropních druhů či poddruhů tzv. myši domácích (názory na nomenklaturu se liší, jedním z důvodů je právě existence jejich vzájemného křížení, viz Živa 1997, 1: 43–45): ve východní a severní Evropě se vyskytuje myš domácí — *Mus (musculus) musculus*, myš západoevropská — *Mus (musculus) domesticus* obývá západní a jižní oblasti kontinentu (obr. 2).

Současné výzkumy potvrdily, že myši hybridní zóna není závislá na vnějších klimatických podmínkách a je takzvaně tenzní, tzn. udržuje se napětím mezi dvěma protichůdnými jevy, migrací a přírodním výběrem (selekcí). S jistým zjednodušením

si tenzní zónu můžeme přiblížit na následujícím příkladu. Přestože je myš tvorem až překvapivě usedlým, někteří jedinci (zpravidla mladí samci) mohou občas putovat i na delší vzdálenosti. Tak se může stát, že např. zvědavý sameček Světlobřichý se na svých toulkách dostane až k „tém druhým“, kde se zakouká do samičky Tmavohřbeté a zplodí s ní potomstvo. Tím se mu podaří nejen předat svoje geny do další generace, což bylo jeho primárním cílem, ale současně rozšířit genetický materiál za hranice vlastního (pod)druhu. V kontextu hybridní zóny to znamená, že čím více takových tuláků existuje a čím delší jsou jejich zálety, tím větší bude oblast obývaná hybridy, tj. hybridní zóna se bude rozšiřovat. Milostný akt pana Světlobřichého s paní Tmavohřbetou ovšem má i svoje negativní následky:

Obr. 3 Schematické znázornění přechodu dvou genetických znaků přes hybridní zónu: zatímco v prvním případě selektivně neutrální znak přechází přes zónu poměrně snadno (a), ve druhém případě bude průniku alel bránit přírodní výběr znevýhodňující křížence mezi oběma formami (b). Výsledkem budou různé šířky křivek popisujících tento přechod (tzv. klin). Jestliže vyneseme šířky těchto klin pro jednotlivé znaky proti jejich známé pozici na chromozomu (c), můžeme lokalizovat oblasti potenciálně odpovědné za vznik reprodukční bariéry (červené šipky; bližší viz samostatný doplňující text). Orig. M. Macholán



kvůli genetickým rozdílům mezi oběma rodiči je plodnost jejich potomků snížena, což neunikne přísnému oku přírodního výběru. Čím je tato porucha výraznější, tím je selekce neúspěšnější. To vede k eliminaci hybridů, a tím k postupnému zužování hybridní zóny. Dynamická rovnováha mezi migrací a selekcí proto udržuje zónu tohoto typu nezávisle na vnějších podmínkách.

V krátkodobém časovém horizontu je šířka tenzí hybridní zóny víceméně stabilní, to však neznamená, že tomu tak musí být i v dlouhodobé perspektivě. Jestliže je např. selekce proti hybridům ve srovnání s migrací o něco slabší, bude se hybridní zóna pomalu rozšiřovat, aniž bychom to mohli zaznamenat (naopak jestliže selekce převládá migraci, bude se zóna postupně zužovat). Naštěstí k vzájemnému kontaktu obou forem myši, a tím ke vzniku hybridní zóny došlo v jižních oblastech Evropy mnohem dříve než na severu, takže můžeme případnou změnu její šířky v čase přímo otestovat. Např. bude-li hybridní zóna ve střední Evropě průkazně širší než v Dánsku, můžeme se domnívat, že reprodukční bariéra mezi myši domácí a myši západoevropskou je příliš slabá, a genetické rozdíly mezi nimi se proto budou postupně rozmývat, až oba (pod)drůhy zcela splynou. Protože srovnání obou částí hybridní zóny neprokázalo významný rozdíl v její šířce, zdá se pravděpodobné, že tato zóna je alespoň v rozpětí několika tisíc let stabilní.

Pozorný čtenář teď může namítnout: jak to ale souvisí se vznikem nových druhů? Ukazuje se, že u myši nemůžeme očekávat existenci jediného „speciálního“ genu, který by sám dokázal způsobit reprodukční izolaci podobně jako gen *Odyseus*. Naopak, na snížení zdatnosti myších hybridů se může spolupodílet několik desítek genů s menšími účinky. Jak je však nalézt? Naštěstí dnes již víme, že hybridní zóna není pro všechny znaky stejně široká, např. průnik různých genetických variant (alel) přes zónu je u znaků nacházejících se na pohlavních chromozomech mnohem obtížnější než u znaků na ostatních chromozomech (tzv. autozomech). Obecně platí, že čím silnější je selekce proti danému znaku (nebo proti znaku, který je v jeho blízkosti), tím je jeho přechod od jedné alely (řekněme typické pro *domesticus*) ke druhé (typické pro *musculus*) náhlejší. Jestliže tedy použijeme dostatečně velké množství znaků rozmístěných víceméně pravidelně po celém myším genomu (tj. podél všech 19 párů autozomů a pohlavních chromozomů X a Y), můžeme teoreticky lokalizovat oblasti, které jsou vystaveny silné selekci a tudíž potenciálně odpovědné za vznik reprodukční bariéry.

Příklad tohoto postupu ukazuje obr. 3. Když si přechod studovaného znaku přes hybridní zónu od jedné varianty ke druhé znázorníme pomocí spojitě křivky, tzv. klíny (blíže samostatný doplňující text, viz dále), bude šířka této klíny pro znak výrazně negativně ovlivňovaný přírodním výběrem mnohem menší než šířka klíny pro znak z hlediska selekce neutrální (obr. 3a, 3b). Vyneseme-li pak šířky klín pro jednotlivé znaky proti jejich pozici na chromozomu a body vzájemně spojíme, bude výsledný graf vzdáleně připomínat průřez horskou krajinou, kde nám některá zvláště hluboká „údolí“ indikují ty části daného chromozomu, na které působí silná selekce znevýhodňující hybridní jedince (obr. 3c). Zde se

může opět projevit jedna z předností myši jakožto evolučního modelu. Můžeme se totiž podívat do bohaté databáze známých myších genů a máme poměrně vysokou šanci, že v inkriminované oblasti objevíme takové geny, které by mohly mít vztah ke vzniku reprodukční bariéry (mohou to být např. takové, které se podílejí na vývoji samčích spermií nebo samičích vajíček, v úvalu však přichází mnohem více možností).

Studium hybridních zón se proto stává významným pomocníkem při řešení otázky vzniku nových druhů, oné v záhlaví uvedené Herschelovy „záhady záhad“. [Pozn.: John F. W. Herschel (1792–1871) byl známý astronom a filozof; jeho zájmy však byly, jak bylo v té době zvykem, mnohem širší, kromě fyziky a geologie se věnoval i jiným

oborům, mj. stál u zrodu fotografie. S významným geologem a jedním z Darwinových inspirátorů, Charlesem Lyellem, se shodoval v názoru, že nové druhy vznikají přirozenou cestou.]

Pokud vyjdeme z představy hybridních zón jakožto přírodních laboratorů či oken do evoluce, můžeme tyto poněkud nadnesené metafory posunout kousek dál. Dosud jsme totiž byli při studiu hybridizace a vzniku druhů v pozici chlapce, který stojí před osvětleným oknem a snaží se alespoň koutkem oka nahlédnout dovnitř. Přes nesporný pokrok v posledním desetiletí se nedá říci, že bychom dnes do oné tajemné místnosti viděli o mnoho víc. Snad ale nebude příliš troufalé tvrdit, že si onen zvědavý chlapec alespoň dal pod nohy stoličku...

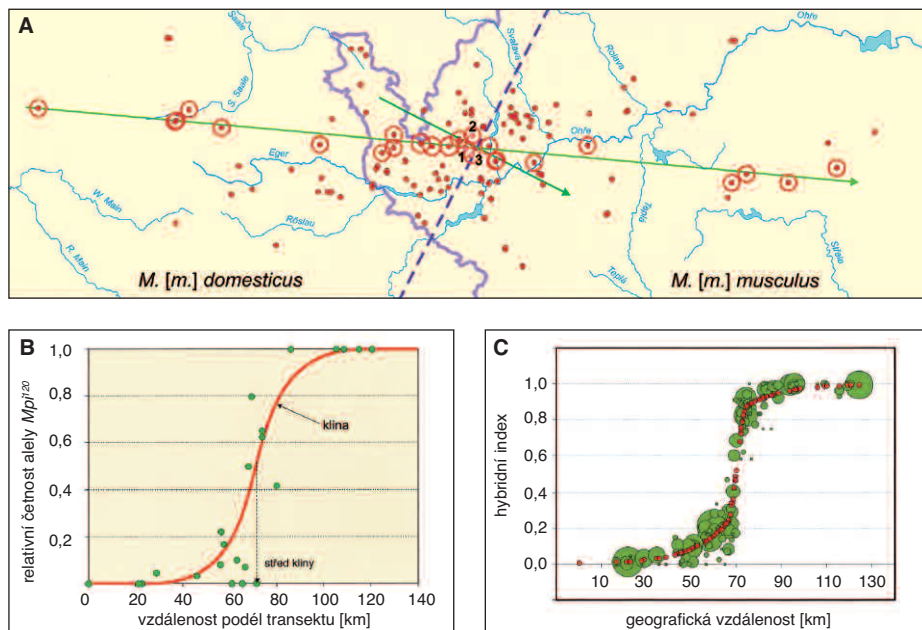
Na návštěvě v přírodní laboratoři aneb kterak nahlížet do „oken evoluce“

Jak nám může analýza hybridní zóny pomoci nalézt odpovědi na otázky vzniku reprodukčních bariér? V typickém případě se snažíme shromáždit materiál podél tzv. transektu, což je linie vedoucí kolmo k hybridní zóně z areálu jednoho druhu do areálu druhého druhu (pojem „druh“ je zde míněn v poněkud volnějším významu, můžeme studovat hybridní zóny mezi poddruhy, populacemi nebo obecně jakýmkoli taxony). Jeden z možných transektů ukazuje

je obr. A: studijní materiál byl v tomto případě získán z červeně zakroužkovaných lokalit nacházejících se podél světle zelené linie vedoucí z areálu myši západoevropské — *Mus (musculus) domesticus* ve východním Bavorsku do areálu myši domácí — *M. (musculus) musculus* v západních Čechách.

Ke genetické analýze použijeme pokud možno takové znaky, které se u zkoumaných druhů vyskytují v odlišných formách

Obr. A Mapa východního Bavorska a západních Čech s vyznačenými lokalitami odchytu domácích myši (červené body). Tradičním postupem při studiu hybridní zóny je shromáždění vzorků podél lineárního transektu, který vede napříč zónou, pokud možno kolmo k jejímu předpokládanému směru. Jeden z takových transektů je znázorněn světle zelenou šipkou, přičemž příslušné lokality jsou označeny červenými kroužky. Jestliže však budeme odchyt provádět na rozsáhlejší území, ve dvourozměrném prostoru, pak ze získaných dat zjistíme, že zóna (přerušovaná čára) je ve skutečnosti více skloněná ve směru hodinových ručiček a náš lineární transekt by měl být správně veden ve směru naznačeném tmavě zelenou šipkou. Chybně vedený transekt může negativně ovlivnit pořadí jednotlivých lokalit, jako je tomu např. u tří lokalit označených čísly 1 až 3, a tím vést i k nesprávným výsledkům ♦ *Obr. B* Relativní četnosti alely genu pro enzym manózofozfát izomerázu Mpi^{20} , typické pro *Mus (musculus) musculus* v jednotlivých populacích podél světle zeleného lineárního transektu na obr. A. Zelenými body je proložena křivka, tzv. klína, která v tomto případě vychází z jednoduchého sigmoidního modelu založeného na hyperbolické tangenciální funkci ♦ *Obr. C* Podobný graf jako na obr. B, v tomto případě však bylo použito celkem 6 enzymatických genů a vzorky ze všech 126 lokalit na obr. A. Velikost „bublin“ je proporční vzhledem k velikosti vzorků z jednotlivých populací. Červené kroužky označují předpokládané četnosti — protože použitý model obsahuje více parametrů než jednoduchý sigmoidní model z obr. B (a také díky většímu množství), je proložení získaných dat na první pohled lepší než v předchozím případě. Orig. M. Macholána



neboli alelách (k analýze můžeme použít jakýkoli znak, my se zde ale zaměříme pouze na znaky genetické). Např. v genu pro enzym manózofofát izomerázu (*Mpi*) se u myši západoevropské vyskytuje pouze alela *Mpi*¹⁰⁰, zatímco pro myš domácí je typická pouze alela *Mpi*¹²⁰. Takové alely označujeme jako diagnostické. Výskyt těchto znaků z jednoho konce transektu na druhý má zpravidla typický průběh, např. budeme-li sledovat výskyt alely *Mpi*¹²⁰ v jednotlivých populacích myši od východního Bavorska až po střední Čechy, bude se její relativní četnost postupně zvyšovat z nuly až na 100 %. Jestliže si relativní četnosti uvedené alely vyneseme do grafu, kde na ose x je pozice jednotlivých populací podél transektu, vidíme, že tento růst není lineární, ale více či méně esovitě zakřivený neboli sigmoidní (obr. B).

Protože naše lokality neleží přesně na přímce, velikost jednotlivých vzorků je omezená a navíc do hry vstupují další vlivy jako náhodné genetické procesy, pasivní transport myši člověkem apod., jsou body v grafu poměrně rozptýlené. Proto, abychom mohli lépe sledovat charakter přechodu studované alely přes zónu, proložíme těmito body křivku — klinu (obr. B), která na základě určitého teoretického modelu co nejlépe vystihuje získaná data, podobně jako u obyčejné regrese. Výběr modelu samozřejmě není zcela subjektivní, ale měl by být založen na příslušném testu.

Ve skutečnosti jsou podobné výzkumy zpravidla složitější. Na obr. C vidíme výsledky jedné z takových studií. V tomto případě bylo analyzováno 6 genů u více než 2 000 myší odchycených na všech lokalitách zobrazených na obr. A. Průměrné relativní četnosti alel na těchto 6 genech nám poslouží jako jednoduchý hybridní index, vyjadřující míru zastoupení variant typic-

kých pro jeden z myších druhů (v tomto případě myši domácí). Velikost „bublin“ je úměrná počtu zkoumaných jedinců na každé lokalitě. Červené body znázorňují teoretické hodnoty hybridního indexu odvozené z použitého modelu. Ten se v tomto případě skládá ze tří matematických funkcí, a proto má křivka charakteristický schodovitý tvar. Z parametrů této klíny i z některých dalších parametrů lze dále odvodit klíčové evoluční ukazatele, např. sílu reprodukční bariéry, míru selekce proti hybridním jedincům a reprodukční zdatnost (fitness) hybridů.

Jak je popsáno v předchozím textu, jestliže tento přístup použijeme na dostatečně velké množství molekulárních znaků rozmístěných víceméně pravidelně podél všech chromozomů, můžeme nakonec lokalizovat oblasti genomu (v ideálním případě i konkrétní geny) odpovědné za vznik reprodukční bariéry. I přes bouřlivý vývoj molekulárně-genetických metod vedoucí ke stále větší automatizaci a tím i snižování nákladů není tento postup finančně ani technicky snadný, jeho teoretický základ je však až překvapivě přímočarý. Ale jak už to v životě chodí, nic není tak jednoznačné, jak to na první pohled vypadá, o čemž svědčí i námi získaná data.

Jestliže se znovu podíváme na obr. A, neunikne nám, že náš jednoduchý lineární transekt není kolmý ke směru hybridní zóny, jak by měl teoreticky být. Není obtížné prokázat, že chybně vedený transekt může vést k nežádoucímu zkreslení výsledků, což lze ilustrovat i na obr. A: podíváme-li se blíže na tři lokality označené čísly 1 až 3, vidíme, že jejich pořadí podél světla zelené linie je 1 → 2 → 3. Pokud bychom však tyto lokality správně seřadili podle tmavě zeleného transektu kolmého na skutečný směr zóny vyznačené přerušova-

nou fialovou čarou, pořadí by se změnilo na 2 → 1 → 3. Protože zřídka kdy budeme průběh hybridní zóny předem znát, je nutné provádět sběr materiálu na větší ploše, nikoli podél lineárního transektu. Navíc zóna nemusí tvořit přímku, ale může se více či méně klikatit v závislosti na geografických či jiných podmínkách.

Ale vraťme se zpět k myším. Je sice pravda, že myši hybridní zóna není ovlivněna klimatem, jak se ještě před několika lety spekulovalo, to ale neznamená, že je nutně zcela nezávislá na vnějších podmínkách. Zóny tenzního typu, ovlivňované pouze migrací a selekcí proti hybridům a nikoli vnějšími podmínkami, se totiž volně pohybují až do stadia, kdy jsou „lapeny“ buď v oblasti nejnižší populační hustoty, nebo v místě nějaké geografické bariéry, přičemž mohou platit obě možnosti (např. uprostřed Labe bude logicky populační hustota myši nulová). Krom toho může být lokální situace v oblasti hybridní zóny poměrně složitá. Je např. známo, že myš jen nerada plave (voda v ní dokonce vyvolává stres), na rozdíl od potkana, pro něhož není problém proplavat záchodovým sifonem. Není proto divu, že i relativně nevelké vodní toky mohou strukturu myši hybridní zóny citelně ovlivnit. Jak naznačují současné poznatky z Dánska i střední Evropy, v lokálním měřítku může být tato zóna spíše mozaikou menších či větších částí se složitou vnitřní dynamikou. Ukazuje se, že některé vžité představy a z nich vycházející evoluční modely nemusí být přinejmenším pro hybridní zónu mezi myši západoevropskou a myši domácí v Evropě zcela adekvátní. To s sebou přináší nutnost shromáždění většího množství studijního materiálu i použití nových metod statistického zpracování dat. Ale to už by bylo téma na další článek.