

נספח 1. דגימה

כדי לבדוק אם ההרכב הגנטי של האוכלוסיות הטבעיות הושפע מהאבקה שמקורה ביערות נטועים, השווינו את ההרכב הגנטי של עצים מבוגרים, בינוניים וצעירים. קביעת גיל עצים מתבצעת על פי מספר הטבעות השנתיות. Brita Lorentzen (תקשורת אישית) בדקה את הרוחב ומספר הטבעות השנתיות של אורנים מגבעת העיזים שבכרמל. הרוחב הממוצע של טבעת שנתית היה 4.3 מ"מ, ועצים שגילם עולה על 50 שנה היו בעלי טבעות שנתיות שרוחבן הממוצע היה 3.4 מ"מ. במחקר זה התבססנו על היקף גזע העצים בגובה החזה, כסמן לגיל העצים, וחילקנו אותם לשלוש קבוצות גודל, האמורות לייצג שלוש קבוצות גיל. דגמנו 51 עצים שהיקפם היה מעל 176 ס"מ המייצגים עצים גדולים שגילם כנראה מעל 70 שנה, ולכן הם כנראה טבעיים ולא ניטעו. דגמנו 130 עצים בינוניים (שהיקפם 103–175 ס"מ), ו-80 עצים קטנים וצעירים (שהיקפם עד 102 ס"מ). מיקום העצים נקבע ונשמר במכשיר ג'י-פי-אס.

נספח 2. קביעת הפרופיל הגנטי וניתוח התוצאות הגנטיות

טביעת אצבע גנטית AFLP

לקביעת הפרופיל הגנטי, השתמשנו בשיטת 'Amplified Fragments Length Polymorphism' (AFLP) המאפשרת לבצע אפיון של הפרופיל גנטי של פרטים בעזרת טביעת אצבע גנטית (Genetic fingerprint) [31]. השיטה מבוססת על חיתוך הדי-אן-איי באנזימי הגבלה (Restriction), ושימוש בזוגות פריימרים (תחלים) שונים היוצרים הגברה סלקטיבית של מקטעי די-אן-איי רבים באורכים שונים, שחלקם שונים וחלקם דומים בין פרטים. הבדל זה מבטא נוכחות והיעדר אתרי רסטריקציה. סמני ה-AFLP (תוצרי ההגברה) הם אתרים דומיננטיים המאפיינים פרופיל גנטי של פרט לפי קיומו או היעדרו של אלל. לפיכך, בשיטה זו לא ניתן לזהות פרטים הטרנזיגוטיים, ואופן חישוב ערכי מגוון גנטי מתבצע על פי תדירות האללים וגודל המדגם. במחקר זה השתמשנו באנזים *MseI* החותך את רצף הבסיסים AATT, ובאנזים *EcoRI* החותך את רצף הבסיסים GAATTC. לאחר מכן ביצענו ליגציה של אדפטורים (כלומר חיברנו את הנשא ומקטע הדי-אן-איי של רצפים ידועים המשמשים פריימרים) שהוספו להם שלושה נוקלאוטידים היוצרים סלקטיביות. כל דגימה הוגברה ב-PCR ארבע פעמים. לכל ארבעת הפריימרים עם רצף הומולוגי לאתר החיתוך ב-*EcoRI* הוסף סמן פלואורני בצבע שונה (אדום, צהוב, שחור וירוק) המאפשר קריאת תוצאות (תוצרי הגברה) במכשיר ייעודי לקריאת קטעים באורכים שונים.

ערכי המגוון הגנטי המתקבלים בשיטה זו נמוכים יחסית לאלה המתקבלים מאתרים קו-דומיננטיים כדוגמת המיקרוסטליטים (מקטעי רצפים חוזרים קצרים). רצפי המיקרוסטליטים מראים מגוון גבוה במספר החזרות ברצף, ולכן הם אתרים עם פולימורפיות גבוהה. מיקרוסטליטים מאפשרים לזהות פרטים הטרנזיגוטיים, לבחון את דגם הרבייה ולבצע מבחני אבהות באוכלוסיות הנבדקות. חיסרון עיקרי בשימוש באתרים אלה הוא הצורך בידע מוקדם על אודות האורגניזם הנבדק (בניגוד ל-AFLP). לכן, אם תיבדק

שונות גנטית באוכלוסיות שידועים בהן רק מספר קטן של מיקרוסטיליטים, הרזולוציה הגנטית יכולה להיות נמוכה ולעיתים לא מספקת. בעיה זו בולטת באוכלוסיות שיש בהן ההבדלים הגנטיים מועטים [7]. דוגמה טובה היא במחקר של מדמוני ואחרים [2], שבחנו את הבדלים גנטיים בין עומדים טבעיים של אורן ירושלים (שמורת המסרק והר פיתולים) לעומדים נטועים שמרחקם לא עולה על 2 ק"מ. ההשוואה נעשתה באמצעות 8 מיקרוסטיליטים מתוך די-אן-איי כלורופלסטי ושלושה מתוך די-אן-איי גרעיני. התוצאות הראו שאוכלוסיות טבעיות של אורן ירושלים בשמורת המסרק אינן שונות גנטית מעצי האורן הנטועים. אך מחקר שנערך כמה שנים לאחר מכן וכלל אנליזה של 10 מיקרוסטיליטים מהדי-אן-איי הגרעיני, ומספר רב יותר של אוכלוסיות טבעיות, הראה שלאוכלוסייה בשמורת המסרק ייחוד גנטי השונה באופן מובהק מכל שאר האוכלוסיות הטבעיות והנטועות של אורן ירושלים [30]. אוכלוסיית המסרק הייתה שונה גנטית גם מהאוכלוסייה הטבעית הקרובה (6 ק"מ) בהר פיתולים [5]. תוצאות אלה הראו שהמחקר הקודם נכשל בזיהוי ההבדל עקב היעדר רזולוציה גנטית מספקת.

לדעתנו, במקרים כאלו יש עדיפות לשימוש בשיטת AFLP שידוע שיש לה רגישות גבוהה יותר מזו שבמיקרוסטיליטים בשל היכולת לדגום אתרים רבים יותר בגנום, ולכן היא מאפשרת לזהות גם הבדלים קלים בין אוכלוסיות [9].

ניתוח התוצאות הגנטיות

הפרופיל הגנטי של כל פרט נקבע והשווה לזה של כל הפרטים האחרים מאותה אוכלוסייה ולכל הפרטים מכל האוכלוסיות האחרות. כדי להעריך את ההבדלים בין העצים של האוכלוסיות הטבעיות מהאקוטיפ המזרחי לבין העצים ביער הנטוע השווינו את הפרופיל הגנטי של העצים הטבעיים מקבוצת העצים הגדולים לזה של העצים מהיער הנטוע. מידת האינטרוגרסיה של גנים מתוך היער הנטוע לאוכלוסיות הטבעיות הוערכה על ידי השוואת הפרופיל הגנטי של העצים הבינוניים והקטנים לזה של העצים הגדולים באוכלוסיות הטבעיות ולזה של העצים מהיער הנטוע.

השונות הגנטית של אוכלוסיות המחקר נאמדה בעזרת ההטרוזיגוטיות הצפויה (He), בתוכנת 6.5 GENALEX [22]. התוכנה מתייחסת ללוקוסים (loci; אתרים בגנום) המוגברים ב-PCR כלוקוסים דומיננטיים. לכן, לא ניתן להבדיל בין הומוזיגוטים להטרוזיגוטים בלוקוס המוגבר, ותדירות הלוקוס נאמדת על פי השורש הריבועי של תדירות הפרטים שהאתר לא הוגבר בהם. על כן, ערך He המרבי הוא 0.5. המרחק הגנטי (Nei's Genetic Distance [19]) בין זוגות האוכלוסיות ומובהקותו נבחנו ב-Exact test, בתוכנת TFPGA [17]. אנליזת קיבוץ (Clustering) בייסאנית לקביעת המספר המשוער של קבוצות גנטיות נבדלות מבין האתרים הנדגמים נערכה בתוכנת STRUCTURE 2.3.4 [23]. קביעת מספר הקבוצות הסביר נעשה בתוכנת Harvester [10].

הערכה איכותית לקיום אינטרוגרסיה של גנים מתוך היער הנטוע לאוכלוסיות הטבעיות נאמדה על ידי מובהקות המרחק הגנטי בין האוכלוסייה הנטועה והאוכלוסיות הטבעיות, ועל ידי דמיון הפרופיל של כל אוכלוסייה וקבוצות הגודל שלה והפרופיל של האוכלוסייה הנטועה על פי אנליזת STRUCTURE. המיקום של כל האוכלוסיות הטבעיות (GPS) ומיקום היערות הנטועים נקבע על פי מפות קק"ל. לאחר מכן חושב המרחק בין העומד הנטוע הקרוב ביותר לבין כל אוכלוסייה שהוערכה כטבעית, ובין כל זוג אוכלוסיות טבעיות. לבדיקת המתאם בין המרחק הגנטי למרחק הגיאוגרפי בין כל זוג אוכלוסיות השתמשנו במבחן MANTEL.

אזורי החיץ

ערכנו ניתוח מרחבי מקדמי לבדיקת האפשרויות להקמת אזור חיץ לשימור של האוכלוסיות הטבעיות, על ידי בידודן מיערות נטועים סמוכים שיוביל לצמצום מעבר הגנים בין עומדים נטועים לאוכלוסיות הטבעיות. רוחב אזור החיץ תלוי במרחק הפצת הזרעים וההתבססות של אורנים שמקורם ביערות נטועים, ובמרחק ההאבקה יעילה. ביצענו ניתוח מרחבי סביב האוכלוסיות הטבעיות בכרמל כדי לבדוק היתכנות של יצירת אזורי חיץ ברוחב 1,000 מ'.

נספח 5. גורמים המשפיעים על מידת הסיכון לשרפה

מידת הסיכון לשרפה תלויה במספר גורמים^[8]: (1) המבנה הטופוגרפי ותנאי האקלים – אוכלוסיות על קו הרכס הן בסיכון גבוה, משום שרוחות מזרחיות מעודדות התפשטות מהירה של האש^[21]. (2) דליקות הצומח – אורנים הם דליקים ומוליכים שרפות יותר מאשר חורש טבעי של אלונים, גריגה, או בתה. לכן, עדיף לשמר אוכלוסיות אורנים המוקפות חורש טבעי. (3) נגישות לציבור – שרפות בכרמל הן תוצאה של רשלנות והצתות מכוונות^[8, 32], לכן יש לתת עדיפות לשימור אוכלוסיות הנמצאות במקומות שנגישים פחות לציבור.

נספח 6. מקורות

- [1] אשכנזי ש. 2004. ממשק הצומח המעוצה של הכרמל בדגש על ממשק יערות אורן ירושלים. הקרן הקיימת לישראל ורשות הטבע והגנים.
- [2] מדמוני ע, ריוב י, זהבי ע ואחרים. 2007. שימור גנטי של אורן ירושלים הגדל בר בישראל: 1. עומד שמורת המסרק בהרי יהודה. יער 9: 15-19.
- [3] וייץ י, פרבולוצקי א וכהן י. 2014. התפשטות אורן ירושלים מיערות נטועים לשטחים פתוחים – תהליכים אקולוגיים והשלכות נופיות. אקולוגיה וסביבה 4(4): 312-320.
- [4] ספריאל א. 2010. התכנית הלאומית למגוון ביולוגי בישראל. המשרד להגנת הסביבה.
- [5] שטייניץ ע. ונתן ר. 2012. אפיון הרכב גנטי באוכלוסיות טבעיות של אורן ירושלים – בחינת אוכלוסיות נוספות מהכרמל משמורת המסרק. דו"ח לרשות הטבע והגנים. האוניברסיטה העברית בירושלים.
- [6] Bittencourt J and Sebbenn A. 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity* 99(6): 580-591.
- [7] Campbell D, Duchesne P, and Bernatchez L. 2003. AFLP utility for population assignment studies: Analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. *Molecular Ecology* 12(7): 1979-1991.
- [8] Carmel Y, Paz S, Jahashan F, and Shoshany M. 2009. Assessing fire risk using Monte Carlo simulations of fire spread. *Forest Ecology and Management* 257(1): 370-377.
- [9] Cornuet JM, Piry S, Luikart G, et al. (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153(4): 1989-2000

- [10] Earl DA. 2012. Structure Harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**(2): 359-361.
- [11] Grunwald C, Schiller G, and Conkle M. 1986. Isozyme variation among native stands and plantations of Aleppo pine in Israel. *Israel Journal of Botany* **35**(3-4): 161-174.
- [12] Hernandez-Tecles E, Osem Y, Alfaro-Sanchez R, and de las Heras J. 2015. Vegetation structure of planted versus natural Aleppo pine stands along a climatic gradient in Spain. *Annals of Forest Science* **72**(5): 641-650.
- [13] Korol L, Shklar E, and Schiller G. 2002a. Diversity among circum-Mediterranean populations of Aleppo pine and differentiation from Brutia pine in their isoenzymes: Additional results. *Silvae Genetica* **51**(1): 35-41.
- [14] Korol L, Shklar G, and Schiller G. 2002b. Genetic variation within *Pinus halepensis* Mill. provenances growing in different microenvironments in Israel. *Israel Journal of Plant Sciences* **50**(2): 135-143.
- [15] KKL-JNF. 2007. Green information: Forest Statistics. The Department of Forest Management and GIS, the Forest Department. Keren Kayemeth Le Israel – Jewish National Fund.
- [16] Lavi A, Perevolotsky A, Kigel J, and Noy-Meir I. 2005. Invasion of *Pinus halepensis* from plantations into adjacent natural habitats. *Applied Vegetation Science* **8**(1): 85-92.
- [17] Miller MP. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- [18] Nathan R, Katul GG, Horn HS, et al. 2002. Mechanisms of long-distance dispersal of seeds by wind. *Nature* **418**(6896): 409-413.
- [19] Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283-292.
- [20] Olden JD, Poff NL, Douglas MR, et al. 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology and Evolution* **19**(1): 18-24.
- [21] Osem Y, Lavi A, and Rosenfeld A. 2011. Colonization of *Pinus halepensis* in Mediterranean habitats: Consequences of afforestation, grazing and fire. *Biological Invasions* **13**(2): 485-498.

- [22] Peakall R and Smouse PE. 2012. GenAEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, **28**(19): 2537-2539.
- [23] Pritchard JK, Wen X, and Falush D. 2010. Documentation for structure software: Version 2.3. www.pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html.
- [24] Rejmánek M and Richardson DM. 1996. What attributes make some plant species more invasive? *Ecology* **77**(6): 1655-1661.
- [25] Schiller G and Grunwald C. 1986. Xylem resin monoterpene composition of *Pinus halepensis* Mill. in Israel. *Israel Journal of Botany* **35**(1): 23-33.
- [26] Schiller G. 2000. Inter-and intraspecific genetic diversity of *Pinus halepensis* Mill. In: Ne'eman G and Trabaud L (Eds). Ecology, biogeography and management of *Pinus halepensis* and *P. brutia* forest ecosystems in the Mediterranean basin. Backhuys: Leiden (The Netherlands).
- [27] Sheffer E, Canham CD, Kigel J, and Perevolotsky A. 2014. An integrative analysis of the dynamics of landscape and local-scale colonization of Mediterranean woodlands by *Pinus halepensis*. *PloS ONE* **9**(2): e90178.
- [28] Shohami D and Nathan R. 2014. Fire-induced population reduction and landscape opening increases gene flow via pollen dispersal in *Pinus halepensis*. *Molecular Ecology* **23**(1): 70-81.
- [29] Steinitz O. 2010. Gene flow between and within Aleppo pine (*Pinus halepensis*) populations (PhD dissertation). Jerusalem: The Hebrew University of Jerusalem.
- [30] Steinitz O, Robledo-Arnuncio JJ, and Nathan R. 2012. Effects of forest plantations on the genetic composition of conspecific native Aleppo pine populations. *Molecular Ecology* **21**(2): 300-313.
- [31] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* **23**(21): 4407-4415.
- [32] Wittenberg L, Malkinson D, Beerli O, et al. 2007. Spatial and temporal patterns of vegetation recovery following sequences of forest fires in a Mediterranean landscape, Mt. Carmel Israel. *Catena* **71**(1): 76-83.
- [33] Zohary M. 1962. Plant life of Palaestine: Israel and Jordan. New York: Ronald Press Co.