

## 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<sup>[8]</sup>: (1) המבנה הטופוגרפי ותנאי האקלים – אוכלוסיות על קו הרכס הן בסיכון גבוה, משום שרוחות מזרחיות מעודדות התפשטות מהירה של האש<sup>[21]</sup>. (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<sup>[8, 32]</sup>, לכן יש לתת עדיפות לשימור אוכלוסיות הנמצאות במקומות שנגישים פחות לציבור.