

סקירה של מכלואים של אורן ברוטיה × אורן ירושלים

תפוצה, הכלאות מבוקרות, זיהוי, ריבוי ועמידות לכנימת המצוקוקוס הא"י

יוסי ריוב^{1*}, ענת מדמוני², לאוניד קורול³, צביקה מנדל⁴, רקפת דוד שורץ³, גלינה שקלאר³, אילון כלב⁵ ורוברט סיטבון⁶

¹ המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים, רחובות

² החוג ללימודי הסביבה, מכללת בית ברל, כפר סבא

³ המכון למשאבי טבע, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, בית דגן

⁴ המכון להגנת הצומח, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, בית דגן

⁵ מחלקת יערנות ופיתוח מקצועי, אגף הייעור, קק"ל, אשתאל

⁶ מהנדס אזור הנגב המערבי, מרחב דרום, קק"ל, גילת

* riov@agri.huji.ac.il

תקציר

מייחורים של אורנים, כולל מכלואים, המאפשרת גם ריבוי של חומר מעצים מבוגרים, שבדרך כלל הוא קשה השתרשות. עם זאת, לריבוי המוני יהיה צורך להשתמש בשיטות אחרות, כמו השרשת ייחורים הפורצים מהברכיבלסטים לאחר גיזום או עוברים סומטיים. בבדיקה שנעשתה בעבר בארץ, מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים גילו עמידות גבוהה יחסית לכנימת המצוקוקוס הא"י, אולם עמידותם נפלה במידה מסוימת מזו של א. ברוטיה. שינויי האקלים, ובעיקר פרקי הבצורת הארוכים יחסית שחלו בשנים האחרונות בארץ, והתמותה שחלה בעקבותיהם, מחייבים נטיעה של מינים עמידים ליובש. בשל ההתפתחות יוצאת הדופן של המכלואים גם ביערות שונים בצפון הנגב, הם עשויים לשמש מקור לאורן עמיד ליובש. נושא זה נבדק במחקר המתנהל בימים אלו.

מילות מפתח: אורן ברוטיה (*Pinus brutia*), אורן ירושלים (*Pinus halepensis*), מכלואים.

הסבר מונחים

און כלאיים (Heterosis): תופעה בה צאצאי הכלאות של גנוטיפים או מינים שונים מראים תכונות משופרות, בעיקר מבחינת קצב הצימוח וממדי העץ, בהשוואה להוריהם.

אנזימי הגבלה (Restriction enzymes): אנזימים החותכים את מולקולת הדנ"א באתר מסוים בהתאם לרצף חומצות הגרעין (נוקלאוטידים) באותו אתר או בסמוך לו.

ברכיבלסטים (Brachiblasts): ענפונים הפורצים מפקע זעיר הנמצא בין בסיסי המחטים בעקבות החלשה או ביטול של השלטון הקדודי, למשל באמצעות גיזום.

דור F₂ של מכלואים: צאצאים מהכלאות עצמיות או הכלאות הדדיות של המכלואים מדור F₁.

מכלואים טבעיים של אורן ברוטיה × אורן ירושלים התגלו לראשונה באיטליה בשנות ה-20 של המאה הקודמת, ולאחר מכן ביוון. אמנם בין שני המינים קיים בידוד פנולוגי חלקי, כלומר תקופת הפריחה שלהם אינה חופפת במלואה, אולם קיימת מידה מסוימת של חפיפה בין הפריחה הנקבית של א. ברוטיה לפריחה הזכרית של א. ירושלים, המאפשרת יצירת מכלואים. בהכלאות מבוקרות שנעשו ביוון נמצא, שניתן לבצע הכלאות בין שני המינים רק כשא. ברוטיה הוא ההורה הנקבי. קצב הצימוח של המכלואים האלו שניטעו ביוון היה גדול משמעותית משל הוריהם, בעיקר בבתי גידול נחותים. מכלואים טבעיים של א. ברוטיה × א. ירושלים אובחנו גם באזורים שונים בארץ על פי ממדיהם הגדולים. המכלואים האלו התגלו ביערות של א. ברוטיה או ביערות מעורבים של א. ברוטיה וא. ירושלים, שמקורות הזרעים ששימשו להכנת השתילים לנטיעתם היו בחו"ל, כנראה ביוון. מכלואים אלו שימשו ומשמשים בסיס למספר עבודות מחקר, שבהן יושמו בין השאר שיטות זיהוי שונות, המבוססות על תכונות מורפולוגיות, איזואנזימים וסמנים מולקולאריים. לאחרונה יושמה בארץ בהצלחה שיטה חדשה לזיהוי מכלואים – Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS). במספר אתרים בארץ נמצאו מכלואים שמקורם היה בהכלאות טבעיות שנעשו כאן. בהכלאות מבוקרות שנעשו ביוון ובישראל בין א. ברוטיה לא. ירושלים נמצא, ששיעור הצאצאים המראים און כלאיים הוא נמוך מאוד. מנתונים אלו ניתן להסיק, שמבחינה מעשית הסיכוי לקבל מכלואים מוצלחים באמצעות האבקה מלאכותית כדי להרבותם באמצעות זרעים הוא קטן, וישנה העדפה לניצול מכלואים מוצלחים שהתגלו ביערות ולהרבות אותם באופן גוטטיבי. בארץ פותחה שיטה לריבוי וגטטיבי



תמונה 1: מכלוא של אורן ברוטיה × אורן ירושלים בחלקה הנטועה באורן ברוטיה ביער גילת בצפון הנגב.
Picture 1: A hybrid of *Pinus brutia* × *P. halepensis* in a *P. brutia* stand in Gilat forest in the northern Negev.

באזור Chalkidiki ביוון לבין האוכלוסייה של א. ברוטיה באי Thasos בצפון הים האגאי (Panetsos, 1986). נוכחות של מין אחד בתוך אוכלוסיות של המין השני, מצב המאפשר יצירת מכלואים, מיוחסת להתערבות האדם. Gola (1924) היה הראשון שדיווח על הכלאות טבעיות בין א. ברוטיה לא. ירושלים באזור Grado באיטליה. מאוחר יותר, Papaioannou (1936) זיהה ותאר מכלואים טבעיים של שני המינים באזור Chalkidiki ביוון. Panetsos (1975) בחן את הפיזור של אוכלוסיות רבות של א. ברוטיה וא. ירושלים ביוון בהסתמך על תכונות מורפולוגיות, ומצא נוכחות של מכלואים בכל המקומות שבהם היה קיים מגע בין שני המינים. זיהוי מכלואים טבעיים ביוון נעשה מאוחר יותר גם באמצעות אנליזה גנטית (Panetsos et al., 1997; Aravanopoulos & Panetsos, 2000). ידוע, שבין א. ברוטיה לא. ירושלים קיים בידוד פנולוגי חלקי, כלומר תקופת הפריחה של שני המינים אינה חופפת במלואה, אולם קיימת מידה מסוימת של חפיפה בין הפריחה הנקבית של א. ברוטיה לבין הפריחה הזכרית של

הכלאות מחזירות של מכלואים (Backcrossings): הכלאות

של המכלואים מדור F_1 עם אחד מההורים.

עוברים סומטיים (Somatic embryos): עוברים המתפתחים

שלא באמצעות ריבוי מיני מתאים שונים שעברו דיפרנציאציה בתנאים של תרבית רקמה. בעולם פותחו שיטות לריבוי המוני של עצי יער באמצעות עוברים סומטיים.

תכונות פנולוגיות: תכונות התפתחותיות, בעיקר צמיחה

ופריחה, שמועדן לאורך השנה מושפע מתנאי האקלים.

תחלים (Primers): מקטעים קצרים של חומצות גרעין

המשמשים כנקודות מוצא לתהליך השכפול של דנ"א.

מבוא

שינויי האקלים, ובעיקר פרקי הבצורת הארוכים שחלו בשנים האחרונות, גרמו לתמותה של עצים רבים של אורן ירושלים ביערות הנטועים בצפון הנגב, ובמידה מסוימת גם באזור הים-תיכוני של הארץ. התמותה רחבת היקף של מין זה והחשש שהיא עלולה להחמיר בעתיד מחייבים לקדם פיתוח של טיפוסים עמידים ליובש של א. ירושלים, שהוא עץ השדרה של היערות הנטועים באזורי הגבעות בצפון הנגב. מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים עשויים להוות מקור לאורן עמיד ליובש. מכלואים אלו, שהתגלו בארצות שונות באגן הים התיכון, כולל באזור הים-תיכוני בארץ, מראים בדרך כלל און כלאיים המתבטא בגדילה נמרצת גם בתנאי סביבה קשים יחסית (תמונה 1). המכלואים שהתגלו בישראל עוררו עניין רב בשל ממדיהם הגדולים יחסית והם שימשו בסיס למספר מחקרים ותצפיות החל משנות ה-80 של המאה הקודמת. בשנים האחרונות התגלו ביערות האורן בצפון הנגב עצים גדולי ממדים הבולטים בחיוניותם, שלפי מאפיינים מורפולוגיים סווגו במכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים. התפתחותם יוצאת הדופן בתנאי הסביבה הקשים יחסית של היערות בדרום, עוררה עניין מחודש במכלואים של שני המינים. בעקבות זאת מתבצע כיום מחקר, שבו נבחנו היבטים שונים של מכלואים אלו. בסקירה הנוכחית מוצג הידע הקיים בארצות-ים-תיכוניות, בעיקר ביוון ובישראל, על המכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים.

מכלואים טבעיים ומכלואים מהכלאות מבוקרות

אגן הים התיכון

א. ירושלים וא. ברוטיה מהווים את שני המינים העיקריים בקבוצת ה-Halepenses. בבתי הגידול הטבעיים קיים בידוד מרחבי בין שני המינים, כשהמרחק הקצר ביותר ביניהם, כ-50 ק"מ, הוא בין האוכלוסייה של א. ירושלים בהר Athos

ובכרמל זוהו כמכלואים באמצעות אפיון מורפולוגי (מדמוני, 2000; Korol et al., 1995) סמנים ביוכימיים (איזואנזימים) (Korol et al., 1995) וסמנים מולקולאריים (צברי, 1994). לאחרונה זוהו עצים בולטים שהתגלו ביער בן שמן וביערות בצפון הנגב כמכלואים באמצעות סמנים מולקולאריים חדשים, שהוכנסו לשימוש בארץ (ריוב וחוב', 2015).

האפשרות של יצירת מכלואים טבעיים בתנאי הארץ נבחנה במספר מחקרים. בבחינת הפנולוגיה של שני המינים באזורים שונים בארץ נמצא, שקיימת חפיפה של מספר ימים בין תקופת הפריחה הנקבית של א. ברוטיה לבין תקופת הפריחה הזכרית של א. ירושלים (מדמוני, 2000; Weinstein, 1989; Madmoni, et al., 2003) המאפשרת קיומה של האבקה בין מינית. מדמוני (2000) ערכה אנליזה גנטית באמצעות סמני RAPD של מחטים שנלקחו משתילים צעירים שהתקבלו מזרעים שנאספו ביער צעיר יחסית של א. ברוטיה, בו הופיעה רק פריחה נקבית, שלידו מצוי יער מבוגר של א. ירושלים. הונח, שבתנאים אלו קיים סיכוי רב לשיעור גבוה של הכלאות בין-מיניות. האנליזה הגנטית אכן הראתה היווצרות של מכלואים ביער הנ"ל. גם תצפיות שנערכו בהתחדשות טבעית שהתרחשה בעקבות שרפה של עומדים סמוכים של א. ברוטיה וא. ירושלים ביער אשתאול, הראתה על קיומם של עצים, שעל בסיס תכונותיהם המורפולוגיות ניתן לסווגם כמכלואים (צ. מנדל וי. ריוב, מידע אישי).

בישראל נערכו גם הכלאות מבוקרות בין א. ברוטיה וא. ירושלים (מדמוני, 2000; Madmoni et al., 2003). מעקב אחר התפתחות הצאצאים בשנתיים הראשונות לאחר הזריעה לא הראה יתרון בצימוח שלהם על זה של שני ההורים. גם ביוון נמצא, שאון כלאיים של צאצאים מהכלאות מבוקרות בין שני המינים התקבל בשיעור נמוך ורק מהורים מסוימים (י. ריוב, מידע אישי). מנתונים אלו ניתן להסיק, שמבחינה מעשית הסיכוי לקבל מכלואים מוצלחים של שני המינים באמצעות האבקה מלאכותית, כדי להרבותם באמצעות זרעים, הוא קטן, וישנה העדפה לניצול מכלואים טבעיים מוצלחים שהתגלו ביערות ולהרבות אותם באופן וגטיבי.

זיהוי מכלואים

זיהוי מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים נעשה בעבודות שונות, שנערכו בעיקר ביוון ובישראל, באמצעות שימוש בתכונות מורפולוגיות ובסמנים ביוכימיים, כימיים ומולקולאריים.

תכונות מורפולוגיות: שימוש בתכונות מורפולוגיות לזיהוי מכלואים נעשה לראשונה על ידי Mouloupoulos & Bassiotis (1961) ובהמשך על ידי הקבוצה של Panetsos (Panetsos, 1997; Panetsos et al., 1975). התכונות שנבחנו התייחסו לאצטרובלים (זווית ביחס לענף, אורך העוקץ ואורך ורוחב

א. ירושלים, המאפשרת יצירת מכלואים (Bassiotis, 1972). ממצאים דומים דווחו גם בישראל (ראה להלן).

ההכלאות המבוקרות הראשונות בין א. ברוטיה לא. ירושלים בוצעו לראשונה על ידי Mouloupoulos & Bassiotis (1961) ביוון. הם דיווחו, שניתן לבצע את ההכלאות בין שני המינים רק כשא. ברוטיה הוא ההורה הנקבי. צאצאים של דור F_1 של המכלואים, שהתקבלו בעבודות שונות שנעשו ביוון, הראו לעתים קרובות און כלאיים, שהתבטא בצימוח נמרץ בכל בתי הגידול שבהם הם ניטעו, ובעיקר בבתי גידול הנחשבים בארץ זו כנחותים (Panetsos et al., 1983; Panetsos, 1986). לעתים, קצב הצימוח של המכלואים היה כפול מזה של הוריהם. עצי מכלוא מדור F_2 או מהכלאות מחזירות (Backcrossings) עם אחד משני ההורים נפלו בדרך כלל באופן משמעותי בקצב התפתחותם מאשר זה של עצי מכלוא מדור F_1 .

ישראל

במהלך השנים דיווחו יערי ירני הקק"ל על מציאותם של עצים גדולי ממדים ביערות נטועים של א. ברוטיה, ולעתים גם בחלקות שבהן מין זה ניטע במעורב עם א. ירושלים, באזורים שונים בארץ. עצים אלו, שסווגו כמכלואים, התגלו ביער גזר (סמוך למושב בקוע), בכרמל (עין כרמל – מוחרקה) וביער שגב. בשנים האחרונות התגלו מכלואים נוספים ביערות המרכז, ביער חדיד (סמוך ליער בן שמן) וביער בן שמן (סמוך לקברות המכבים), ובמספר יערות באזור הדרום: יער יתיר, יער להב, יער מיתר, יער גילת, יער אמציה ויער לכיש. לעתים, המכלואים הם העצים היחידים ששרדו בחלקות יער שונות בצפון הנגב. מרבית העצים שסווגו כמכלואים אכן זוהו ככאלה באמצעות סמנים מולקולאריים (ראו להלן). המכלואים שהתגלו ביערות בצפון הנגב מהווים בסיס למחקר המתבצע בימים אלו, שבמהלכו נקבעו נקודות הציון של העצים, נאספו פרטים על החלקות שבהן הם מצויים ומחלקם התקבלו שתילים באמצעות השרשת ייחורים (תמונה 2) (ריוב וחוב', 2015). שתילים אלו ישמשו מקור לייחורים לייצור שתילים לבחינת העמידות ליובש ולכנימת המצוקוקוס הא"י. סביר להניח, שהמקור של המכלואים שהתגלו בארץ היו זרעים שנאספו ביוון באזורים שבהם שני המינים גדלים בסמיכות (חת, 1990), אולם בקק"ל לא קיים רישום של מקורות הזרעים שמהם יוצרו השתילים שניטעו ביערות הנ"ל. קצב הצימוח והרקע הגנטי של חלק מהמכלואים שהתגלו בישראל נבדקו במספר מחקרים. חת (1990) דיווח, שבאופן כללי הגובה והקוטר של המכלואים ביער גזר, שגילם היה 15 שנה במועד שבו נערכו המדידות, היו גדולים בכ-50% מאלו של עצי א. ברוטיה המפותחים ביותר שגדלו בסמוך. במרווחי נטיעה גדולים יחסית גובה המכלואים וקוטרם היו גדולים בכ-60% ו-100% אחוז, בהתאמה, מאלו של עצי א. ברוטיה ששימשו להשוואה. העצים שסווגו כמכלואים ביער גזר

גודלו העצום של הגנום של מיני האורן השונים, שנע בין 19 ל-40 ביליון נוקליאוטידים (Morse et al., 2009) הקשה על ריצוף הדנ"א ופיתוח סמנים מולקולאריים ספציפיים. בהיעדר מידע מפורט על הרצף של גנום האורן, השיטות המולקולאריות התבססו בעבר על שונות גנטית כללית בין המינים. אחת השיטות שהייתה נפוצה בתחום זה היא שיטת ה-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), המבוססת על השוואה של קטעי דנ"א הנבחרים באופן אקראי. מאחר שתהליך הבחירה האקראית שווה בכל הדוגמאות הנבדקות, ניתן לזהות שונות בין הפרטים הנבדקים ולשייכה למוצאם, וכך לזהות מכלואים. כמו מרבית השיטות המולקולאריות, גם שיטת ה-RAPD מבוססת על ריאקצית Polymerase Chain Reaction (PCR), הנתונה להשפעתם של גורמים שונים, כמו ריכוז ואיכות הדנ"א ותנאי הריאקציה, ולכן היא נחשבת לפחות הדירה משיטות מתקדמות אחרות. צברי (1994) הייתה הראשונה שיישמה סמנים מולקולאריים לזיהוי מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים באמצעות שיטת ה-RAPD, תוך בחינה של מספר גדול מאוד של תחלים. מבין התחלים שנבחנו, ניתן היה לזהות את המכלואים שהתגלו ביער גזר רק באמצעות שני התחלים הבאים: 5'-GTCCCGACGA-3' ו-5'-CCGATATCCC-3'. שימוש בתחלים אלו אפשר גם לזהות מכלואים שנוצרו בהכלאות טבעיות ביערות ישראל (מדמוני, 2000; Madmoni et al., 2003).



תמונה 2: שתילים של מכלואים שונים של אורן ברוטיה × אורן ירושלים שהוכנו באמצעות השרשת ייחורים.

Picture 2: Seedlings of various hybrids of *Pinus brutia* × *P. halepensis* grown from rooted cuttings.

של האצטרובל), מחטים (אורך, רוחב, מספר שורות של פיוניות ומספר פתחים של בלוטות שרף) וזרעים (אורך, רוחב ואורך כולל של הזרע וכנף הזרע). בעבודה המאוחרת של הקבוצה של Panetsos נבחנו 22 תכונות מורפולוגיות, שהראו הבדלים ברורים בין א. ברוטיה וא. ירושלים, מתוכן נמצאו 14 תכונות שנתנו ערכי ביניים שנבדלו באופן מובהק משני ההורים בדגימות מעצים שסווגו כמכלואים. בהמשך, פותח מודל סטטיסטי, שלטענת המחברים נותן ביסוס טוב יותר להבחנה בין מכלואים באמצעות תכונות מורפולוגיות מסוימות (Dounavi et al., 2001). Korol וחוב' (1995) בחנו את המכלואים שנתגלו ביער גזר ובכרמל (המוחקר) בהשוואה לא. ברוטיה וא. ירושלים, בהתבסס על 10 תכונות מורפולוגיות. מתוך התכונות שנבחנו, חמשת התכונות הבאות: רוחב המחטים, משקל טרי ויבש של המחטים, מספר שורות של פיוניות למחט ואורך של עוקץ האצטרובלים, הראו הבדלים מובהקים בין המכלואים בשתי החלקות לבין שני ההורים.

סמנים אנזימטיים: העבודה הראשונה לזיהוי מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים באמצעות איזואנזימים נעשתה בישראל (Korol et al., 1995), בהתבסס על מערכות אנזימטיות שלגביהן נמצאו הבדלים בין שני ההורים (Schiller et al., 1988; Conkle et al., 1986). בעבודה זו נמצא, שניתן לזהות את המכלואים שנמצאו ביער גזר ובכרמל באמצעות איזואנזימים של מערכות אנזימטיות מסוימות. תוצאות דומות התקבלו בעבודות שנעשו ביוון עם מכלואים טבעיים ומכלואים שהתקבלו בהכלאות מבוקרות (Paentsos et al., 1997; Moulalis et al., 1999; Aravanopoulos et al., 2004).

סמנים כימיים: בזיהוי מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים באמצעות סמנים כימיים הושם הדגש על ההרכב והרמה של טרפנים בשרף. Gallis & Panetsos (1997) מצאו, שאין הבדל בהרכב הטרפנים בין המכלואים לבין ההורים, אולם היה הבדל ברור ביניהם ברמתם, כשבמכלואים נמצאו ערכי ביניים בין שני ההורים ברמה של מספר טרפנים עיקריים. בעבודה מאוחרת יותר צוין, שהבדלים כמותיים בין שני ההורים למכלואים במונוטרפנים α -pinene, myrcene, β -pinene ו-3- δ -carene מהווים סמנים טובים לזיהוי מכלואים (Gallis, 2005).

סמנים מולקולאריים: מכלואים בין מינים מהווים שילוב של שני גנומים גרעיניים, אך בנוסף לדנ"א הגרעיני, מצוי במכלואים המתקבלים גם דנ"א באברוני התא, המיטוכונדריות והכלורופלסטים. הדנ"א באברוני התא עובר בדרך כלל בתורשה מדור לדור, מההורה הנקבי בלבד, אולם במחטניים שונים, ובעיקר בסוג אורן, הדנ"א הכלורופלסטי מורש על ידי ההורה הזכרי (Neale & Sederoff, 1989). על בסיס העובדות המתוארות לעיל, פותחו שיטות מולקולאריות שונות, המבוססות על רצפי דנ"א, לזיהוי מכלואים באורנים.

הכלורופלסטי בסוג אורן מורש על ידי ההורה הזכרי, ניתן לזהות באמצעות שיטה זו מכלואים, אם קיימת שונות גנטית בין ההורים. ואכן השיטה יושמה גם לזיהוי מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים (Bucci et al., 1998; Aravanopoulos et al., 2000). השימוש בשיטה נפוץ עד היום לאנליזה גנטית של אורנים (ראו למשל Steinitz, 2010; Steinitz et al., 2012; Kurt et al., 2012).

אחת השיטות שפותחו בעקבות הידע שהצטבר על שונות בנוקלאוטיד בודד היא שיטת ה-PCR-RFLP, או בשמה האחר Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) (Uncu et al., 2015). בניגוד לשיטת ה-RFLP המקורית, שיטת ה-CAPS מבוססת על שונות ספציפית בנוקלאוטיד בודד במקטע מוגדר בדנ"א, והיא מצריכה מידע מוקדם של רצף הדנ"א. בשיטה זו נעזרים בריאקציה ה-PCR על מנת לקבל עותקים רבים של אותו מקטע מוגדר, שבו מצויה שונות באתר ההגבלה באמצעות תחלים ספציפיים. על התוצר המתקבל מפעילים אנזים חיתוך ובוחנים את אורך המקטעים שהתקבלו במכלוא לעומת שני הוריו הפוטנציאליים. בשיטה זו נעזרו לזיהוי מכלואים בין האורן האירופאי *P. sylvestris* לבין *P. mugo* (Danusevičius et al., 2013), והיא מיושמת בהצלחה גם במחקר המתנהל בימים אלו (ריוב וחוב', 2015) לאנליזה גנטית של אורן ירושלים ואורן ברוטיה ומכלואים שלהם (איור 1).

לאחרונה דווח על זיהוי של אורנים ים-תיכוניים, ובכלל זה מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים, בשיטת ה-High Resolution Melting (HRM), תוך שימוש ברצפים קצרים של הגן הכלורופלסטי *trnL* כסמנים לדנ"א כלורופלסטי (Ganopoulos et al., 2013). שיטה זו עושה שימוש בטכניקת ה-PCR בזמן אמיתי ומאפשרת זיהוי שונות בין פרטים באמצעות סמן פלורסנטי – הטמפרטורה שבה נפרדים שני גדילי הדנ"א בשלב חימום תוצרי ה-PCR. מאחר שהעלות של השימוש בשיטה זו גבוהה יותר מזו של שיטת ה-CAPS, יושמה השיטה השנייה לזיהוי מהיר וזול של המכלואים שהתגלו לאחרונה בארץ.

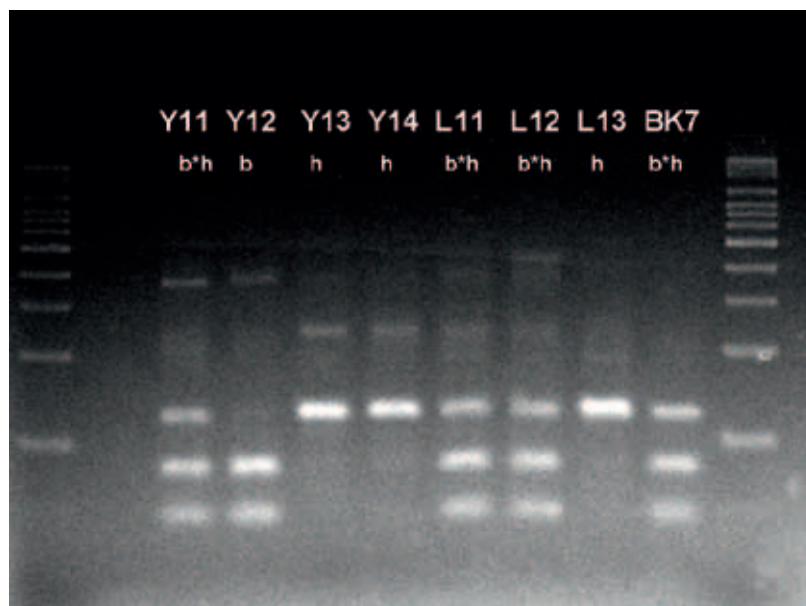
ריבוי וגטטיבי באמצעות השרשת ייחורים

קבלת שתילים באמצעות ריבוי וגטטיבי חיונית לבחינת תכונותיהם של טיפוסים מוצלחים המתקבלים בעבודות השבחה, ובהמשך לריבוי המוני של טיפוסים שיוכחו כבעלי התכונות הרצויות. ריבוי וגטטיבי הכרחי בעבודות השבחה המתבססות על מכלואים.

מרבית העבודות שעסקו בריבוי וגטטיבי של מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים בחנו ריבוי באמצעות השרשת ייחורים. בעבודה שנעשתה ביוון הייתה הצלחה בהשרשה של ייחורים שנלקחו משתילים של מכלואים בני 4 שנים,

שיטה נוספת, המבוססת גם היא על השונות הכללית ואינה מצריכה מידע מוקדם של רצף הדנ"א, היא שיטת ה-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), שבה נחתך או לא נחתך הדנ"א על ידי אנזימי הגבלה באתרים מסוימים שנבדלים בין מינים שונים. תוצרי החיתוך הנבדלים המתקבלים באנליזה זו מאפשרים להבדיל בין מינים ולזהות מכלואים שלהם. בשיטה זו השתמשו למשל בזיהוי מכלואים של מיני אורנים אמריקאיים (Devey et al., 1991; Wagner et al., 1987), אולם לא נעשה בה שימוש לזיהוי מיני אורנים ים-תיכוניים ומכלואים שלהם.

מאוחר יותר החלו להשתמש בסמני דנ"א מיקרוסטיליים הידועים גם בשם Simple Sequence Repeats (SSRs). הם סמני דנ"א המבוססים על רצפים פשוטים (2-6 נוקלאוטידים) חוזרניים, כאשר מספר החזרות של הרצף הפשוט שונה בין מין למין. פיתוח סמני SSRs מצריך ידע לגבי רצף הדנ"א, ולכן רוב סמני ה-SSRs שפותחו לזיהוי אורנים שייכים לגנום הכלורופלסטי או המיטוכונדריאלי, שכן גנומים אלו שמורים בעולם הצמחים וניתן היה לעשות שימוש בסמני SSRs של מינים אחרים. במהלך השנים, פותחו סמנים בודדים גם לדנ"א גרעיני, ועם פיתוח שיטות מתקדמות לריצוף גנומי הקיימות כיום, ישנה אפשרות להגדיל את מאגר הסמנים המולקולאריים האלו. Vendramin וחוב' (1996) פיתחו תחלים לאנליזה גנטית של מינים שונים של אורנים באמצעות סמני SSRs כלורופלסטים. מאחר שכאמור הדנ"א



איור 1. זיהוי מכלואים שונים של אורן ברוטיה × אורן ירושלים באמצעות סמנים מולקולאריים בשיטת ה-Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS). b*h = מכלואים; b = אורן ברוטיה; h = אורן ירושלים; Y = יער יתיר; L = יער להב; BK = יער בקוע.

Fig. 1: Identification of various hybrids of *Pinus brutia* × *Pinus halepensis* by molecular markers using the Cleaved Amplified Polymorphic Sequence method. b*h = hybrids; b = *Pinus brutia*; h = *Pinus halepensis*; Y = Yatir forest; L = Lahav forest; BK = Bekoa forest.

(ריוב וחוב', 2015). מאחר שניתן להשריש בהצלחה ייחורים הפורצים מברכיבלסטים בעקבות גיזום, יהיה ניתן לקבל מספר גדול של שתילים ממספר קטן של צמחי אם, שיראו תכונות רצויות לניסויים ואף לריבוי המוני. אפשרות אחרת לריבוי המוני היא שימוש בעוברים סומטיים.

עמידות לכנימת המצוקוקוס הא"י

כנימת המצוקוקוס הא"י (*Matsucoccus josephi*), חדרה לארץ כנראה בראשית המאה ה-20 מקפריסין. החל משנות ה-60 של המאה ה-20, הכנימה גרמה לתמותה המונית של יערות רבים של א. ירושלים, שהוא רגיש מאוד לכנימה (גולן וחוב', 1983). הנזקים החמורים שנגרמו על ידי הכנימה הביאו לשינוי בהרכב מיני האורן הניטעים ביערות הארץ, בעיקר החלפת א. ירושלים בא. ברוטיה כמין המחטני העיקרי לנטיעה. א. ברוטיה הוא הפונדקאי הטבעי של הכנימה ואינו נפגע על ידה. בעבודה מקיפה שנעשתה בארץ נמצא, שהרגישות לכנימה שונה בין מקורות זרעים שונים של א. ירושלים (Mendel, 1984; 1998). הוכח, שא. ירושלים יווני עמיד יחסית לכנימה, ולכן הנטיעה של א. ירושלים בארץ, בעיקר בצפון הנגב שאינו מתאים לנטיעה של א. ברוטיה, מתבססת על אקוטיפ זה. יש לציין, שכנימת המצוקוקוס הא"י אינה מצויה ביוון, ולכן העמידות לכנימה של א. ירושלים יווני נבעה משינויים גנטיים שחלו עם השנים, ולא בשל לחצי ברירה של הכנימה. א. ירושלים יווני נחשב על ידי יצרני הק"ל גם כעמיד יחסית ליובש, אולם ניתן לראות התנוונות ותמותה הנובעים מיובש גם של אקוטיפ זה באזורים הדרום-מזרחיים של יער יתיר (י. ריוב, מידע אישי).

הדברה כימית של כנימת המצוקוקוס הא"י ביער אינה מעשית. היא יקרה מאוד, יעילותה מוטלת בספק ביער בוגר ואין היא רצויה מבחינה סביבתית. לאויבים הטבעיים של הכנימה ישנה חשיבות מסוימת בצמצום אוכלוסייתה, אך פעולתם אינה מספקת על מנת למתן את הפגיעה הנגרמת למקורות של זרעים רגישים של א. ירושלים או לתת-מינים של א. ברוטיה, כמו א. אלדרי, שאף הם רגישים לכנימה. בעקבות התמותה ההמונית של עצי א. ירושלים חלו שינויים בצפיפות ובגילים של עומדי א. ירושלים, וכפועל יוצא מכך חלה ירידה בצפיפות האוכלוסייה של הכנימה ובנזק שנגרם ליערות א. ירושלים בארץ. אולם, בשנים האחרונות שוב נצפית פגיעה משמעותית בעצים של א. ירושלים באזורים שונים בארץ. יש לציין, שלמרות שאוכלוסיית הכנימה ביערות של א. ירושלים בדרום קטנה יחסית, גם ביערות אלו נצפו נזקים שנגרמו על ידה.

העבודה היחידה על עמידות מכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים לכנימת המצוקוקוס הא"י נעשתה בישראל (מדמוני, 2000; Madmoni et al., 2003), באמצעות שתילים

שהתקבלו מהכלאות מבוקרות (Panetsos et al., 1994). לרקע הגנטי של השתילים, שמהם נלקחו הייחורים, הייתה השפעה בולטת על שיעור ההשתרשות, כשקלון אחד השתרש בשיעור הקרוב ל-100%, ואילו קלון שני השתרש רק בשיעור של 25%. בעבודה זו נעשה שימוש בשני סוגי ייחורים, ייחורים אמיריים מענפים רגילים וכאלו מענפונים שפרצו מברכיבלסטים (ראו להלן). למיטב ידיעתנו, לא היה יישום של ממצא המחקר לריבוי המוני של מכלואים.

ריבוי וגטטיבי של מכלואים שנעשה בישראל התבסס על מחקרים שבחנו השרשה של א. ירושלים. בעבודה הראשונה, שבחנה השתרשות של א. ירושלים, התקבל שיעור מסוים של השתרשות (כ-10%) מצמחי אם בגיל של 4-5 שנים (קפלן וחוב', 1958). המבורגר (1988) בחנה ביסודיות את הקשר בין השלב ההתפתחותי של צמחי האם, יובנילי ובוגר, לבין כושר ההשתרשות. היא מצאה שיעור השתרשות גבוה מאוד בייחורים שנלקחו משתילים בשלב היובנילי (עד גיל של כשנה), שקטן באופן חד עם העלייה בגיל של צמחי האם. מעל לגיל של 4 שנים, שיעור ההשתרשות היה אפסי. מתוך הנחה שהשבחה של א. ירושלים בארץ תתבסס על סלקציה של עצים בוגרים, בחנו ריוב ועצמון את ההשפעה של טיפולים שונים על ההשתרשות של ייחורים מעצים בוגרים של א. ירושלים. הם מצאו, שהשרשה בחורף, קירור הייחורים למספר שבועות לפני ההשרשה ב-4 מ"צ וטיפול בייחורים בתערובת של IBA ותצמיד של אוקסין אפשרו שיעור השתרשות משמעותי, שהגיע לעתים קרובות לעשרות אחוזים, גם בייחורים שנלקחו מעצים בוגרים מאוד (תוצאות שלא פורסמו). התצמיד של אוקסין, המסונתז במעבדה שלנו, הוא חומר שבו האוקסין קשור לחומצת אמינו, וממנו הוא משתחרר בצורתו החופשית לאחר הטיפול בייחורים באמצעות אנזימים המצויים ברקמות הצמח. היתרונות של תצמידי אוקסין הם שחרור איטי של האוקסין הפעיל, תנועה אקרופטלית (מלמטה למעלה) בייחורים ופיטוטוקסיות נמוכה (Riov, 1993).

מדמוני (2000) עשתה שימוש בממצאים אלו והצליחה להשריש בהצלחה ייחורים שנלקחו ממכלואים של א. ברוטיה × א. ירושלים בני כ-20 שנה שזוהו ביער גזר. השתילים שהתקבלו מייחורים שהשתרשו שימשו לבדיקות שונות, כמו הרגישות לכנימת המצוקוקוס הא"י ולנטיעה של חלקת מבחן בגילת, שבה נעשתה השוואה בין המכלואים לבין מקורות זרעים שונים של א. ברוטיה וא. ירושלים. חלקה זו קיימת עד היום ומראה התפתחות יפה. עם זאת, בדומה לממצאים שהתקבלו על ידי Panetsos וחוב' (1994), שיעור ההשתרשות של חלק מהמכלואים שנבחנו היה נמוך או אפסי, ממצא הממחיש שוב את הקשר בין כושר ההשתרשות לרקע הגנטי של הייחורים. גם בהשרשה של ייחורים של המכלואים מיערות הדרום במחקר המתנהל כיום, התקבלו הבדלים גדולים בשיעור ההשתרשות בין המכלואים השונים

חת, ד. (1990). התפתחות מכלואי אורן ירושלים × אורן ברוטיה ביער גזר. השדה, ע"א, 467-465.

מדמוני, ע. (2000). מכלואים של אורן ברוטיה × אורן ירושלים עם דגש על חיוניות ונביטה של גרגרי אבקה של אורנים ים-תיכוניים. עבודת דוקטור, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים.

צברי, ג. (1994). איפיון מיני האורנים העיקריים ביערות הארץ ע"י סמנים מולקולריים. עבודת גמר, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים.

קפלן, י., הורוביץ, א.ת., ויזל, י. וזהרי מ. (1958). ניסיונות פרלימינאריים בריבוי וגטטיבי של איקליפטוס המקור ואורן ירושלים. ליערן, ח' (4-3), 5-8.

ריוב, י., קורול, ל., שקלאר, ג. ומשה, י. (2015). מכלואים של אורן ברוטיה × אורן ירושלים: מופי, מדידה, בחינת הרקע והכנת שתילים לבחינת העמידות ליובש ולכנימת המצוקוקוס הא"י. דו"ח מחקר 10-03-007 מוגש לקרן קימת לישראל.

Aravanopoulos, F.A., Drouzas, A.D., Wang, X.R., Panetsos, K.P. & Moulalis D. (2000). Preliminary results on the inheritance of the chloroplast genome in *Pinus brutia* Ten. In: N. Gozukirmizi, (Ed.), *2nd Balkan Botanical Congress*, May 14-18, 2000, Istanbul, Turkey 2: 195-200.

Aravanopoulos, F.A. & Panetsos, K.P. (2000). A population genetic analysis of a natural hybrid zone between *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus brutia* Ten. In: K.P. Panetsos, (Ed.), *Proceedings of Conference on Adaptation and Selection of Mediterranean Pinus and Cedrus for Sustainable Afforestation of Marginal Agricultural Lands*. June 2-6, 2000, Mytilene, Greece, pp. 67-76.

Aravanopoulos, F.A., Panetsos, K.P. & Skaltsoyiannes, A. (2004). Genetic structure of *Pinus brutia* stands exposed to fire. *Plant Ecology*, 171: 175-183.

Bassiotis, C. (1972). Crossability of the Mediterranean pine-species of the sub-genus *Diploxylon*. *Annals of Agriculture and Forestry Faculty Thessaloniki*, 15: 219-287.

Bucci, G., Anzidei, M., Madaghiele, A. & Vendramin, G.G. (1998). Detection of halotypic variation and natural hybridization in halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Molecular Ecology*, 7: 1633-1643.

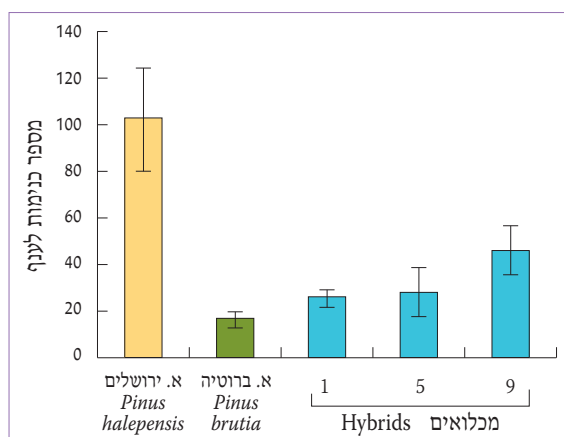
Conkle, M.T., Schiller, G. & Grunwald, C. (1988). Electrophoretic analysis of diversity and phylogeny of *Pinus brutia* and closely related taxa. *Systematic Botany*, 13: 411-424.

Danusevičius, D., Buchovska, J., Stanys, V., Šikšnianienė, J.B., Marozas, V. & Bendokas, V. (2013). DNA marker based identification of spontaneous hybrids between *Pinus mugo* and *P. sylvestris* at the Lithuanian sea-side. *Nordic Journal of Botany*, 31: 344-352.

Devey, M.E., Jermstad, K.D., Tauer, C.G. & Neale, D.B. (1991). Inheritance of RFLP loci in a loblolly pine three-generation pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, 83: 238-242.

Dounavi, K.D., Koutsias, N. & Panetsos, K.P. (2001). Natural interspecific hybridization between *Pinus brutia* (Ten.) and *Pinus halepensis* (Mill.), verified by using the logistic regression modeling on morphological characters. *Forest Genetics*, 8: 151-158.

Gallis, A.T. (2005). Study of the genetic control of four volatile monoterpenes in *Pinus brutia* × *Pinus halepensis* hybrids. Implications for protection and management



איור 2. שיעור האילוח בכנימת המצוקוקוס הא"י של שתילים של מכלואים שונים של אורן ברוטיה × אורן ירושלים מיער בקוע, בהשוואה לזה של אורן ירושלים ואורן ברוטיה (מדמוני, 2000).

Fig. 2: Infestation rate by *Masuococcus josephi* of seedlings of various hybrids of *Pinus brutia* × *Pinus halepensis* from Bekoa forest, in comparison with that affecting *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* (Madmoni, 2000).

שהתקבלו מהשרשת ייחורים שנלקחו ממספר מכלואים שהתגלו ביער גזר. נמצא, שעמידות המכלואים לכנימה הייתה גבוהה משמעותית מזו של א. ירושלים, אולם נפלה במידה מסוימת מזו של א. ברוטיה (איור 2). לעומת זאת, הרגישות של צאצאים של הכלאה מחזירה טבעית של מכלואים ביער שגב, כנראה עם א. ברוטיה, עלתה בהרבה על זו של א. ירושלים. יש גם לציין, שמכלואים של א. ירושלים וא. ברוטיה עם א. שחור (*P. nigra*) התגלו כרגישים לכנימת המצוקוקוס (Mendel, 1992). ממצאים אלו מדישים את החשיבות של בחינת העמידות של גנוטיפים חדשים. קיימת זיקה ברורה בין עמידות שדה לכנימה שנצפית בעצים בוגרים של מקורות זרעים שונים של א. ירושלים לבין עמידות שמציגים שתילים צעירים מאותם מקורות זרעים בעקבות אכלוס מלאכותי בבתי צמיחה (Mendel, 1984; 1998). מכאן ניתן לקבוע אילו מבין המכלואים הינם עמידים לכנימה באמצעות אילוח של שתילים צעירים שיתקבלו מהם בריבוי וגטטיבי. חשוב לציין, שכנימת המצוקוקוס הא"י פוגעת באורן באמצעות שיבוש מערכת הובלת המים של הצמח (Liphshitz & Mendel, 1987; 1989). מכאן סביר להניח, שקיים קשר בין עמידות ליובש לבין עמידות לפגיעה על ידי הכנימה.

מקורות

גולן, י., מדר, צ. ומנדל, צ. (1983). כנימת המצוקוקוס ביערות אורן ירושלים בישראל. השדה, ס"ד, 361-357.

המבורגר מ. (1988). בחינת שיטות לשיפור השתרשות ייחורים של אורן ירושלים. עבודת גמר, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים.

- Mouloupoulos, C. & Bassiotis, C. (1961). Artificial hybrids of *Pinus halepensis* and *Pinus brutia*. *Annales of the Agricultural and Forest Faculty, Aristotelian University of Thessaloniki*, 6: 159–185.
- Neale, D.B. & Sederoff R.R. (1989). Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 212–216.
- Panetsos C.P. (1975). Natural hybridization between *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* in Greece. *Silva Genetica*, 24: 163–168.
- Panetsos K.P. (1986). Genetics and breeding in the group halepensis. *Foret Mediterraneene*, 8: 5–12.
- Panetsos K.P., Moulalis, D. & Mitsopoulos, D. (1983). Artificial hybrids between *Pinus brutia* and *P. halepensis* in Greece. Growth adaptation. *Report of the Laboratory of the Forest Genetics and Forest Plant Breeding, University of Thessaloniki, Greece*.
- Panetsos, K., Scaltosyiannes, A. & Alizoti, P. (1994). Effect of genotype and cutting type on the vegetative propagation of the pine hybrid (*Pinus brutia* (Ten) and *Pinus halepensis* (Mill)). *Annals of Forest Science*, 51: 447–454.
- Panetsos, K., Scaltosyiannes, A., Aravanopoulos, F.A., Dounavi, K. & Demetrakopoulos, A. (1997). Identification of *Pinus brutia* Ten., *Pinus halepensis* Mill. and their putative hybrids. *Silvae Genetica*, 46: 253–257.
- Papaioannou, J. (1936). Über Artbastarde zwischen *Pinus brutia* Ten. und *Pinus halepensis* Mill. in Nordost Chalkidiki (Griechenland). *Forstwissenschaftliches Centralblatt*, 58: 194–205.
- Riov, J. (1993). Endogenous and exogenous auxin conjugates in rooting of cuttings. *Acta Horticulturae*, 329: 284–288.
- Schiller, G., Conkle, T.N. & Grunwald, C. (1986). Local differentiation among Mediterranean populations of Aleppo pine in their isoenzymes. *Silvae Genetica*, 35: 11–19.
- Steinitz, O. (2010). *Gene flow between and within Aleppo pine (Pinus halepensis) population*. Ph.D. Thesis, The Hebrew University of Jerusalem.
- Steinitz, O., Robledo-Arnuncio, J.J. & Nathan, R. (2012). Effects of forest plantations on the genetic composition of conspecific native Aleppo pine populations. *Molecular Ecology*, 21: 300–313.
- Uncu, A.T., Frary, A. & Doganlar, S. (2015). Cultivar Origin and Admixture Detection in Turkish Olive Oils by SNP-Based CAPS Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 2284–2295.
- Vendramin, G.G., Lelli, L., Rossi, P., & Morgante, M. (1996). A set of primers for amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology*, 5: 595–598.
- Wagner, D.B., Fournier, G.R., Saghaimarouf, M.A., Williams, S.M., Dancik, B.P. & Allard, R.W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 2097–2100.
- Weinstein, A. (1989). Geographic variation and phenology of *Pinus halepensis*, *P. brutia* and *P. eldarica* in Israel. *Forest Ecology and Management*, 27: 99–108.
- of forest ecosystems in Greece. *Proceedings of the 9th International Conference on Environmental Science and Technology*, 1–3 September, 2005, Rhodes island, Greece, pp. B–231–236.
- Gallis, A.T. & Panetsos, K.P. (1997). Use of cortical terpenes to discriminate *Pinus brutia* (Ten.), *Pinus halepensis* (Mill.) and their hybrids. *Silvae Genetica*, 46: 82–88.
- Ganopoulos, I., Aravanopoulos, F., Madesis, P., Pasentsis, K., Bosmali, I., Ouzounis, C. & Tsaftaris, A. (2013). Taxonomic identification of Mediterranean pines and their hybrids based on high resolution melting (HRM) and *trnL* approaches: from cytoplasmic inheritance to timber tracing. *Plos One*, 8: e60945.
- Gola, G. (1924). Sopra alcuni ibridi tra *Pinus pinaster*, *P. halepensis* e *P. Brutia* di Grado, *Atti Accademia Scientifica Veneto-Trentino-Istriana, (Padua)* 3: 72–74.
- Korol, L., Madmoni, A., Riov, J. & Schiller, G. (1995). *Pinus halepensis* × *Pinus brutia* subsp. *brutia* hybrids? Identification using morphological and biochemical traits. *Silvae Genetica*, 44: 186–190.
- Kurt, Y., Gonzalez-Nartinez, S.C., Alia, R. & Isik, K. (2012). Genetic differentiation in *Pinus brutia* Ten. using molecular markers and quantitative traits: the role of altitude. *Annals of Forest Science*, 69: 345–351.
- Lipshitz, N. & Mendel, Z. (1989). Pathological changes in the cortex of *Pinus halepensis* are related to injury by *Matsucoccus josephi*. *Canadian Journal of Botany*, 67: 2692–2703.
- Lipshitz, N. & Mendel, Z. (1987). Histological studies of *Pinus halepensis* stem xylem affected by *Matsucoccus josephi* (Homoptera: Margarodidae). *IAWA Bulletin, New Series*, 8: 369–378.
- Madmoni, A., Schiller, G., Moshe, Y., Tsabari, G., Mendel, Z. & Riov, J. (2003). Controlled and open pollination between *Pinus brutia* (Ten.) and *Pinus halepensis* (Mill.) in Israel and hybrid performance. *Israel Journal of Plant Sciences*, 51: 213–222.
- Mendel, Z. (1998). Biogeography of *Matsucoccus josephi* (Homoptera: Margarodidae) as related to host resistance in *Pinus brutia* and *P. halepensis*. *Canadian Journal of Forest Research*, 28: 323–330.
- Mendel, Z. (1992). The occurrence of *Matsucoccus josephi* in Cyprus and Turkey and its relation to decline of Aleppo pine. *Entomologia Generalis*, 17: 299–306.
- Mendel, Z. (1984). Provenance as a factor in susceptibility of *Pinus halepensis* to *Matsucoccus josephi* (Homoptera: Margarodidae). *Forest Ecology and Management*, 9: 259:266.
- Morse A.M., Peterson D.G., Islam-Faridi M.N., Smith K.E., Magbanua Z. & Garcia S.A. (2009). Evolution of genome size and complexity in *Pinus*. *PLoS ONE*4: e4332.
- Moulalis, D., Panetsos, K.P., Skaltsoyiannes, A., Aravanopoulos, F.A., Tsaktsira, M. & Pasagiannes, G. (1999). Identification and production of F₁ artificial hybrids among *brutia* and Aleppo pines. In: *Proceedings of the 8th Pan-Hellenic Conference of the Hellenic Forest Science Society*, April 6–8, 1998, Alexandroupolis, Greece. pp. 354–360.