

זיהוי ואפיון מיקרואורגניזמים בקרקעות שינטוע תפוח
Identification and Characterization of Microorganisms in Apple Orchard Soils

יעל לאור, דורון הולנד, איברהים סעדי, עירית בר יעקוב, כאמל חאטיב
מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער

עודד ביזה

הפקולטה לביולוגיה, הטכניון, חיפה

בהשתתפות: אפרת בר, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער והפקולטה לביולוגיה,
הטכניון, חיפה

פברואר 2009

שבט תשס"ט

תקציר

בעיית השינטוע הנה בעיה מרכזית בענף התפוח בישראל. במחקר זה מיושמת טכנולוגיה רגישה (DGGE) במטרה לזהות מיקרואורגניזמים אשר עשויים להיות מעורבים בתופעת השינטוע גישה זו מבוססת על השוואת תוצרי PCR מקרקע משונטעת לעומת קרקע שאינה משונטעת. במסגרת המחקר נבחנות פלטפורמות הניסוי הבאות: 1. מעקב גדילה ואיתור מיני מיקרואורגניזמים דיפרנציילים בשיטות מולקולריות במיני-חלקות בנוה יער (5 עצים כל אחת) עם זן Smoothee המורכב על כנה 4-13. 2. מעקב גדילה ואיתור מיני מיקרואורגניזמים דיפרנציילים בחלקות תפוח בחוות מתיתיהו הכוללות 6 סוגי כנות שהורכבו על זן Smoothee (M.H.13-4, M.H.15-6) בניסוי עציצים שכולל קרקע בתולה או משונטעת עם או ללא הוספת שורשי עץ תפוח עקור. התפתחות העצים בנוה יער פחותה באופן משמעותי בחלקה המשונטעת לעומת החלקה הבתולה, גם כשלוש שנים לאחר הנטיעה. בחוות מתיתיהו, ההבדל בין החלקה המשונטעת לחלקה הבתולה קטן יותר אך מובהק גם כן ברוב הכנות, כשנתיים לאחר הנטיעה. על בסיס השוואת תוצאות DGGE מ DNA שהופק מפני השורשים מהחלקות בנוה יער, רוצפו שישה בנדים של חיידקים דיפרנציאליים (*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Flavobacterium flevense*, *Streptomyces*, *Kribbella sancallistae*, *Micrococcus luteus*) ותוכנו פריימרים ספציפיים לסריקה של כלל הדוגמאות. במקביל, נמשכת העבודה לריצוף 13 מיני פטריות דיפרנציאליים שנמצאו בהשוואת DNA שהופק מפני השורשים מהחלקות בנוה יער.

1. מבוא ותיאור הבעיה

אחת הבעיות המרכזיות בענף התפוח היא תופעת עייפות הקרקע בחלקות שינטוע (נטיעה מחדש בחלקה שגדל בה לפני כן מטע מאותו המין). הסימפטומים העיקריים למחלת השינטוע הם צימוח מעוכב ועצים לא מפותחים, עלים כלורטיים ורגישות מוגברת למחלות שונות, המתבטאים בסופו של דבר ביבולים נמוכים. למרות שהבעיה ידועה מזה שנים, יש בישראל הכרח לשנטע משום שרוב הקרקעות הפנויות לנטיעות חדשות של תפוח הן קרקעות בהן גודלו עצי תפוח בעבר. בשל חשיבותה, נחקרה תופעה זו בהיקף רחב במדינות שונות בעולם. אולם, ריבוי הגורמים האפשריים, כולל ביוטיים ואביוטיים, המשתנים גם ממקום למקום, לא הוביל עד כה למסקנות חד משמעיות הן בקשר לגורמים המשמעותיים ביותר והן בקשר לדרכי הטיפול. יעילותם הטובה יחסית של טיפולי עיקור וחיטוי של הקרקע מחזקים את הסברה כי הגורמים הביוטיים אחראיים במידה רבה לתופעה זו. הנחת העבודה של המחקר הנוכחי היא ששינוי החל באוכלוסיות המיקרואורגניזמים בקרקע נטועה כתוצאה מפעילות ממושכת של השורשים הוא הגורם לבעיה. מתוך כך נגזרת מטרת ביניים של השוואת קרקעות נטועות ולא נטועות מבחינת המיקרופלורה הנמצאת בהן.

עם הרחבת השימוש בכלים מולקולאריים בתחום האקולוגיה המיקרוביאלית, התווספו יכולות חדשות לאפיון טוב יותר של התופעה, ובעיקר הכנסת השימוש בטכנולוגיית PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) המאפשרת

הפרדה ברזולוציה גבוהה מאוד של מולקולות DNA קטנות (300-400 bp), השונות ביניהן במספר בסיסים בודדים. השימוש בטכנולוגיה זו בהקשר למחלת השינטוע החל בשנים האחרונות. טרם נעשה שימוש בכלים אלו לאיפיון התופעה בישראל.

מטרות המחקר שהוגדרו: 1. לאפיין שינויים באוכלוסיות מיקרואוגניזמים בקרקע משונטעת לעומת קרקע בתולה. 2. לזהות את המיקרואורגניזמים הגורמים לבעיית השינטוע.

2. חלקות הניסוי

בשנים הקודמות של המחקר הוכשרו חלקות ניסוי בשני אזורים גיאוגרפיים שונים: גליל עליון (חוות מתתיהו) ועמק יזרעאל (נווה יער). יש חשיבות רבה בבחירת שני אזורים כי יתכן ומחלת השינטוע באה לידי ביטוי באופן שונה בקרקעות שונות ובתנאים שונים. בנוסף, בשנה זו הועמד ניסוי עציצים בשטח המטע של נווה יער (פירוט בהמשך).

חוות מתתיהו: הוגדרו 4 חלקות בתיאום עם חוות מתתיהו. למעט הקומפוסט אשר פוזר באחת מהחלקות הבתולות (ראה להלן) לא היו טיפולים מיוחדים בשאר החלקות. כל החלקות מטופלות בקוטל עשבים מסוג ראונדאפ (גליפוסט) במינון 1%. **חלקת ביקורת:** חלקת תפוח (זן זהוב, כנה 13/4) של מטע ותיק שנעקר באוקט' 2004. החלקה כוללת 3 שורות שלא נעקרו. **חלקת שינטוע:** מטע עקור של עצי תפוח (המשך חלקת הביקורת). חילקה זו ניטעה בפברואר 2007 **חלקה בתולה עם היסטוריה של קיווי:** הקיווי נעקר בנוב' 2004. בחלקה זו פוזר קומפוסט לאחר העקירה (בנוב' 2004) בשיעור של 10 מטר קוב לדונם. שתי שורות מחלקה זו ניטעו בפברואר 2007. הניסוי כלל שתילי תפוח מהזן Smoothee מורכב על 6 סוגי כנות שונות: M.H.13-4, M.H.15-6 M.H.16-7, MALUS, M.H.18-9, M.H.17-8.

נווה יער: חלקות הניסוי בנווה יער הוכשרו בשנת 2006 **חלקת ביקורת:** מטע ותיק של תפוח (זן זהוב 972, כנה 4-13). המטע ניטע בפב' 1998. **חלקת שינטוע:** ב-29 למרס 2006 נעקרו 5 עצי תפוח מהמטע הוותיק (מזן topred שהורכב על כנת מכלוא של חשבי עם morton). ב-4 אפריל 2006 ניטעו במקומם שתילים חדשים (זן Smoothee, כנה 4-13). הנטיעה ללא גדודיות. **חלקה בתולה עם היסטוריה של שזיף ואפרסק:** 5 שתילי תפוח (זן Smoothee, כנה 4-13) ניטעו בחלקה הבתולה (לא גודל בה תפוח בעבר). האפרסק נעקר מחלקה זו בפב' 2005, ובשנה שלאחר מכן גודלה בה חיטה אשר נקצרה כשבוע לפני הנטיעה. הנטיעה ללא גדודיות. בדו"ח הקודם פורט מערך הדיגום בעזרת Rhizobox. בשל מיעוט חדירת שורשים לתוך קופסאות הדיגום בשתי העונות הקודמות הוחלט להפסיק בשלב זה את השימוש ב Rhizobox. עם זאת, הדוגמאות שנאספו בשנים 2006-7 בעזרת ה Rhizobox מיועדות להמשך בדיקות מולקולריות.

ניסוי עציצים:

ניסוי העציצים תוכנן במטרה לבחון את השינויים הדינמיים שחלים באוכלוסיות המיקרואורגניזמים בקרקע המשונטעת והבתולה וכן את האפשרות ששינויים חשובים בהקשר לשינטוע מתחוללים בקרקע בהשפעת שאריות שורשים מנותקים לאחר עקירת העץ. לשם כך נעקרו שני עצים בוגרים המורכבים על כנת חשבי 13.4 מהמטע הוותיק בנווה יער, שורשיהם נחתכו למקטעים קצרים (כ 2 ס"מ) ועורבבו לקבלת תערובת הומוגנית של שורשים. מערך הניסוי הורכב מעציצים בנפח של כ-10 ליטר כאשר לכל עציץ הועברו 5 ליטרים של קרקע (בתולה או משונטעת, ראה פירוט הטיפולים), מעליה הונחו כ 50 גרם שורשים, כמות המדמה ויזואלית את צפיפות השורשים שנותרים בקרקע לאחר העקירה. על גבי שכבה זו פוזרו עוד כ- 2 ליטר קרקע. הטיפולים כללו: 1. קרקע בתולה + שורשים, 2. קרקע בתולה ללא שורשים, 3. קרקע משונטעת (שהיא למעשה קרקע מהחלקה הבוגרת במקום בו נעקר העץ) + שורשים, 4. קרקע משונטעת ללא שורשים. כל הדליים הוצבו בשורה אחת (5 חזרות לכל טיפול, כל חזרה בוצעה בשני דליים כאשר הדוגמאות שנלקחו משני הדליים אוחדו, סה"כ 40 דליים, איור 1) העציצים הוצבו בתוך תעלה כדי לדמות את תנאי הסביבה של המטע (טמפ', לחות, תאורה).



איור 1. ניסוי העציצים שהועמד בשנת המחקר הנוכחית במטע התפוח בנווה יער.

3. שיטות מעבדה

גישת העבודה של המחקר כוללת את השלבים הבאים:

1. הפקת DNA מדוגמאות שורשים (מפני השורש), מהריזוספירה (קרקע צמודה לשורש) וכלל הקרקע.
2. הגברת מקטעי DNA עם פריימרים כלליים או ספציפיים.
3. איתור בנדים דיפרנציאליים בין דוגמאות מחלקה משונטעת לחלקה בתולה.
4. הפרדה, שיבוט וריצוף בנדים דיפרנציאליים.
5. הכנת פריימרים ספציפיים למקטעים הדיפרנציאליים.

6. שימוש בפריימרים הספציפיים לאימות נוכחות מיקרואורגניזמים דיפרנציאליים בקרקע משונטעת ובתולה.

שיטות העבודה המולקולריות פורטו בנספח 1 לדו"ח הקודם. אותן שיטות משמשות אותנו בהמשך המחקר למעט הפריימר לפטריות שהוחלף ב ITS5 עם GC-clamp (במקום GC-ITS1):

ITS5	5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3'
GC-clamp	5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCGG -3'

הפריימר הוחלף משום שלא הצלחנו לחזור על התוצאות שהתקבלו עם הפריימרים הקודמים בעוד שהתוצאות שהתקבלו עם הפריימר החדש חוזרות על עצמן.

בדיקת ריכוז ציאנידים (ניסוי עציצים):

אחת ההשערות המופיעות בספרות היא שהפרשות ציאנידים מהווים את אחד הגורמים למחלת השינטוע (Rumberger *et al.*, 2007). ריכוז הציאנידים נבדק לפי Rumberger *et al.*, 2007. נשקלו 4 גרם קרקע לתוך מבחנת זכוכית בנפח של 20 מ"ל והוספו 10 מ"ל תמיסת 5mM NaOH. המבחנות טולטלו ב- 100 RPM למשך 30 דקות, סורכזו ב- 6500 RPM למשך 10 דקות והנוזל העליון סונן בפילטר 0.2 µm. ריכוז הציאניד בתמיסה נבדק בעזרת ערכת ה- Cyanide Test (Merck) לפי הוראות היצרן ובהשוואה לסטנדרט של תמיסת Cyanide standard solution (Merck). התוצאות שהתקבלו בכל הדוגמאות שנבדקו עד כה (זמן אפס, חודש וחודשיים ממועד הצבת ניסוי העציצים) הראו ריכוזי ציאניד קטנים מ- 0.03 mg CN/l שהוא סף הרגישות של הערכה.

בדיקת נוכחות רעלנים בקרקע משונטעת כנגד חיידקי E. Coli (ניסוי עציצים):

כיוון שזוהתה פטריית פניציליום באחד הבגדים הדיפרנציאליים שהופיעו בחלקה הבתולה ולא במשונטעת (שימוש בפריימרים הקודמים, ITS2, GC-ITS1), נבדקה האפשרות שבחלקה הבתולה הפרשות אנטיביוטיות מונעות את התפתחותם של מיני פתוגניים מסוימים, בעוד שבקרקע המשונטעת, מיעוט או העדר הפרשות אלה מאפשר את שגשוגם של פתוגניים אלה. בכדי לבדוק אפשרות שכזאת נבדקה נכחות חומרים אנטיבקטריאליים לחיידקי E. Coli DH10 B.

הבדיקה בוצעה באופן הבא:

הכנת תרחיף של הקרקע: נשקלו 2 גר' קרקע לתוך מבחנה של 50 מ"ל, הוספו 20 מ"ל בופר פוספאט 0.2 M, pH 7.2, והתמיסות טולטלו למשך שעה ב- 150 RPM.

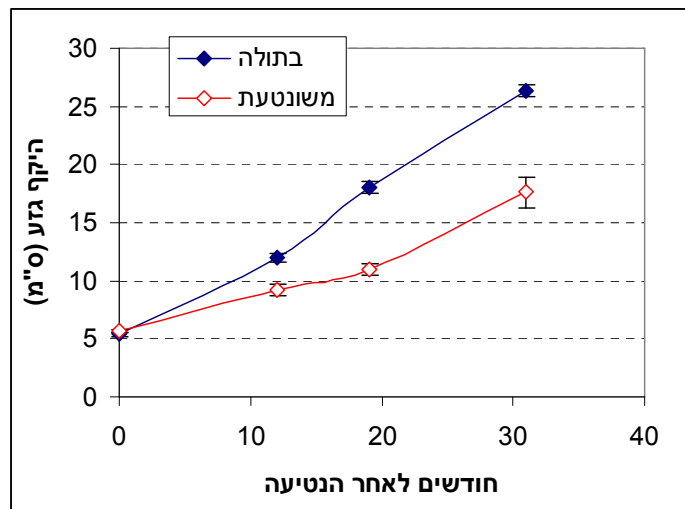
הכנת תרחיף חיידקי E. Coli DH10 B: תרבית חיידקי E. Coli 110 B גודלה למשך לילה במצע LB נוזלי. התרחיף עבר סרכוז ב- 6500 RPM למשך 10 דקות. משקע החיידקים הורחף ב- 10

מי"ל תמיסת בופר פוספאט 0.2 M, pH 7.2. על צלחות פטרי שמכילות מצע מוצק של LB אגר פוזרו 200 מיקרוליטר מתרחיף החיידקים בעזרת מקל דריגלסקי. בכל צלחת הוכנו 5 בארות בקוטר 5 מ"מ, ולכל באר הועברו 50 מיקרוליטר של תרחיף הקרקע. לאחת הבארות הועברו 50 מיקרוליטר של בופר פוספאט כבקורת. הצלחות הודגרו ב- 36°C למשך לילה. קוטר ההילה מסביב לבאר הינו אינדקס לנוכחות חומרים אנטיביוטיים לחיידקים. התוצאות שהתקבלו בכל הדוגמאות שנבדקו עד כה (זמן אפס, חודש וחודשיים ממועד הצבת ניסוי העציצים) הראו שתמיסת הקרקע אינה מכילה חומרים אנטיביוטיים יחסית לביקורת.

4. תוצאות

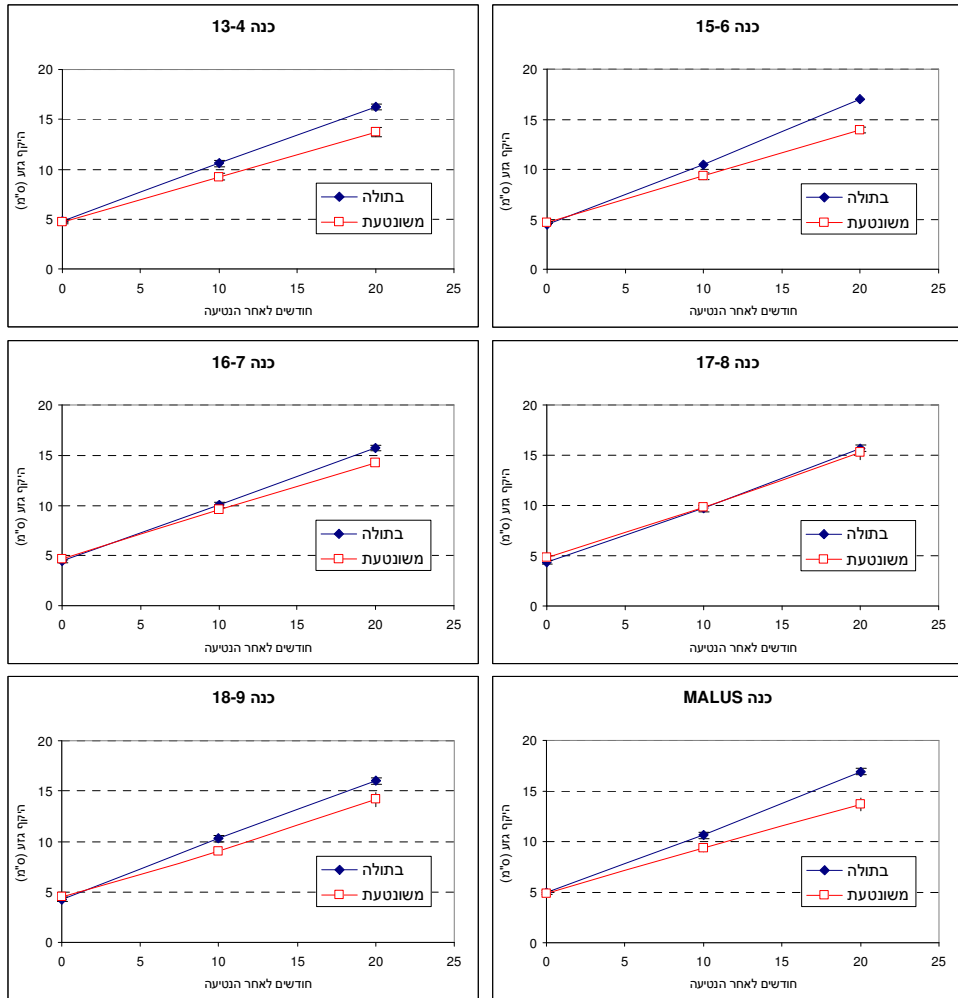
4.1 מעקב אחר גידול עצי תפוח בחלקה משוונטעת ובחלקה בתולה

נוה יער: החלקות בנווה יער ניטעו בחודש אפריל 2006 ונעשה מעקב אחר התפתחות העצים בחלקה המשוונטעת ובחלקה הבתולה. ארבעה חודשים לאחר הנטיעה בנווה יער (אוגוסט 2006), נראו עצים גדולים יותר עם הסתעפויות רבות יותר בחלקה הבתולה לעומת החלקה המשוונטעת. מגמה זו נשמרה גם לאחר 19 חודשים, בנובמבר 2007 וגם בהמשך, עד סוף 2008 (איור 2). גם לאחר 31 חודשים ממועד הנטיעה עדיין העצים בחלקה הבתולה היו גדולים באופן משמעותי מאשר בחלקה המשוונטעת (פי 1.5). למרות שהיקפי הגזע של העצים בשתי החלקות היו דומים בזמן הנטיעה.

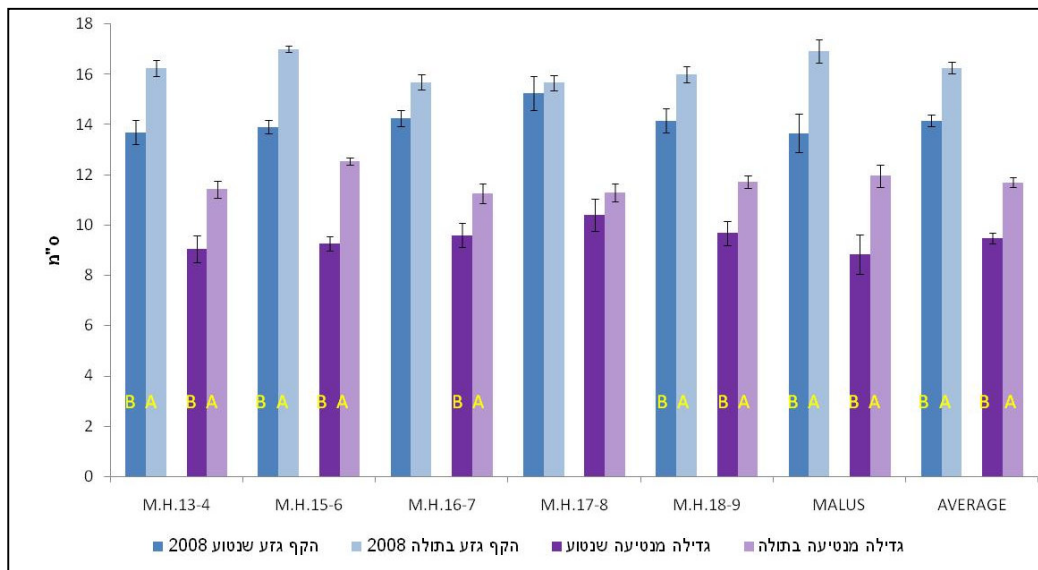


איור 2: היקפי הגזע של עצי תפוח בחלקה משוונטעת ובחלקה בתולה בנווה יער עד 31 חודשים ממועד הנטיעה.

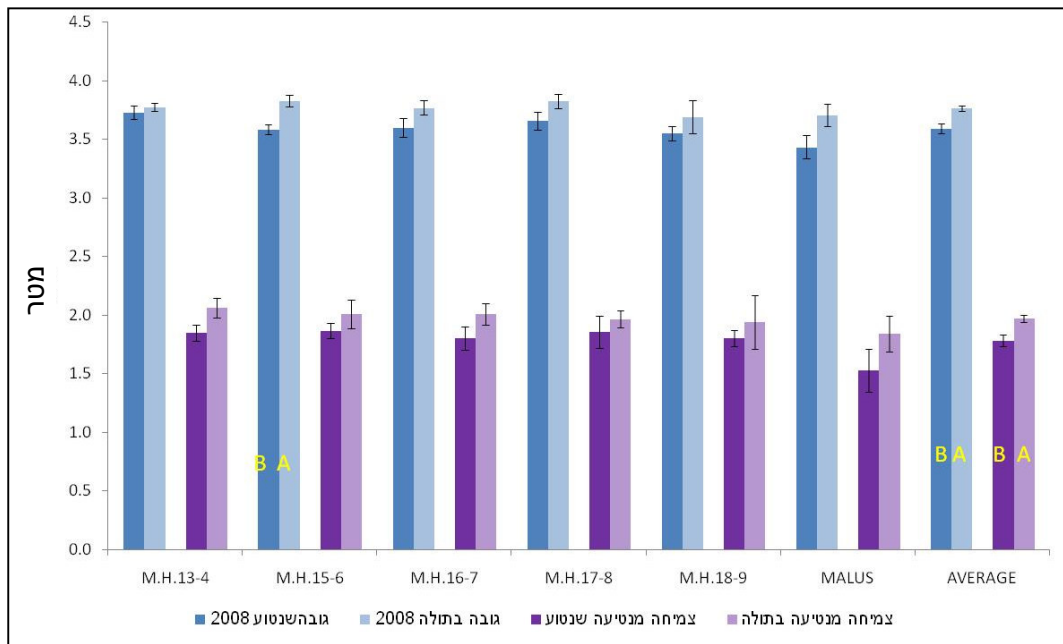
חוות מתיתיהו: מעקב אחר התפתחות העצים בחוות מתיתיהו עד 20 חודשים ממועד הנטיעה מצביע על הבדלים ההולכים וגדלים בין החלקות הבתולות והמשוונטעות, בכל הכנות למעט בכנה 17-8 (איור 3). ההבדלים בהיקפי הגזע, גובה העץ וגדילה בשנת 2008 מתוארים באיורים 4-5. ההבדלים היו מובהקים בכל הכנות למעט 17-8 ו 4-13.



איור 3: הקיפי גזע של זן smoothy על כנות שונות, עד כשנתיים ממועד הנטיעה, בחלקה משונטעת ובחלקה בתולה בחוות מתתיהו.



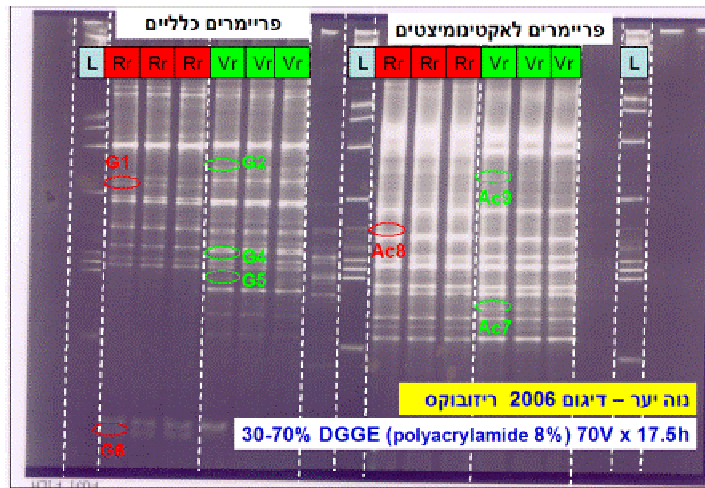
איור 4: השוואת הקף הגזע וגדילתו בזן smoothy על כנות שונות בחלקת השנטוע ובחלקת הביקורת ("בתולה") בחוות מתתיהו בשנת 2008.



איור 5. השוואת גובה העץ וצמיחתו בזן smoothy על כנות שונות בחלקת השנטוע ובחלקת הביקורת ("בתולה") בחוות מתיתיהו בשנת 2008.

4.2 סריקת דוגמאות

בדו"ח הקודם הצגנו השוואה בין תוצאות ה DGGE שהתקבלו בעזרת פריימרים כלליים של חיידקים ושל אקטינומיציטים, עבור DNA שהופק מפני השורשים מהחלקות בנוה יער ב 2006 (איור 6).

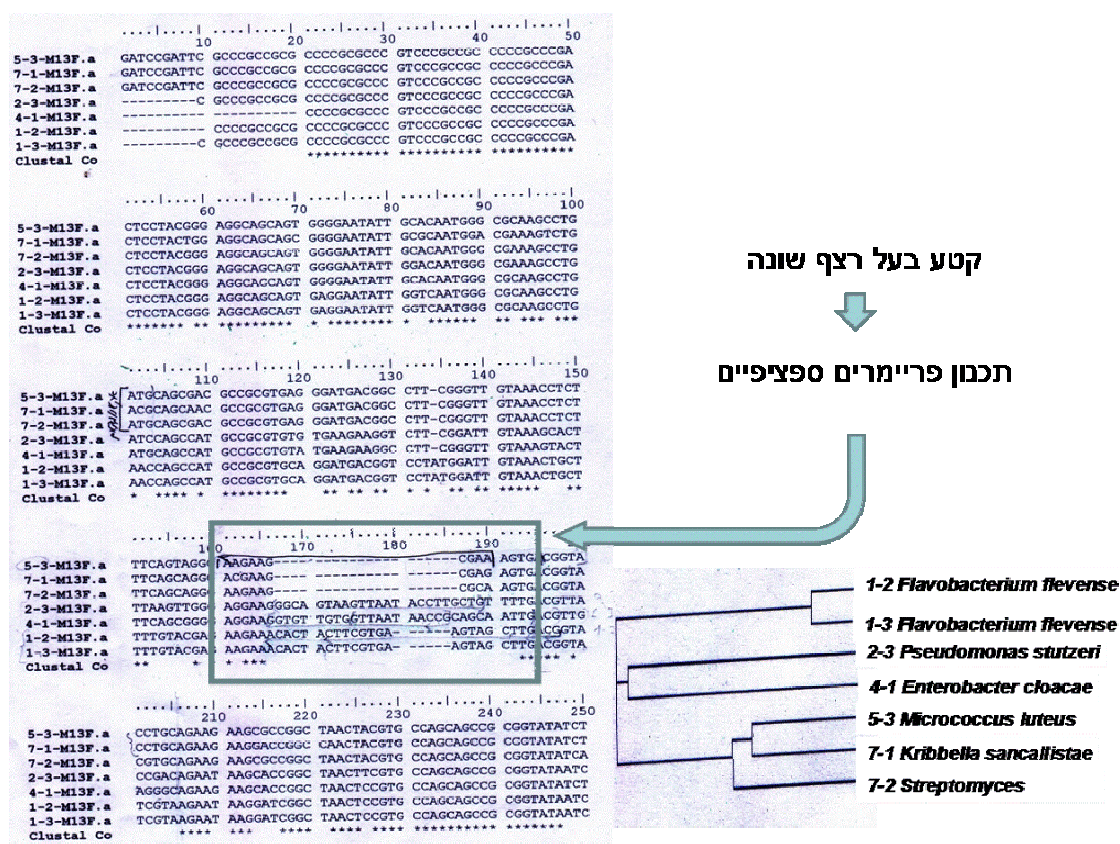


איור 6. גיל DGGE של אוכלוסיות חיידקים כללים ואקטינומיציטים משורשים של עצי תפוח מחלקה משונטעת וחלקה בתולה (שלוש חזרות לכל חלקה). Rr (Replant-root) – שורשים מחלקה משונטעת, Vr (Virgin-root) – שורשים מחלקה בתולה. הבנדים המסומנים הופרדו מהגיל לצורך שיבוט וריצוף.

הבנדים הדיפרנציאליים הופרדו מהגיל, נוקו, שובטו ונשלחו לריצוף. עד כה זוהו 6 בנדים דיפרנציאליים:

- G-1. *Flavobacterium flevense* – זוהה בחלקה המשונטעת אך לא בבתולה.
- G-2. *Pseudomonas stutzeri* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת.
- G-4. *Enterobacter cloacae* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת
- G-5. *Micrococcus luteus* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת
- Ac-7-1. *Kribbella sancallistae* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת
- Ac-7-2. *Streptomyces* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת

על בסיס תוצאות הריצוף, נבחרו מקטעים דיפרנציאליים ותוכננו פריימרים ספציפיים לסריקה של כלל הדוגמאות (איור 7)

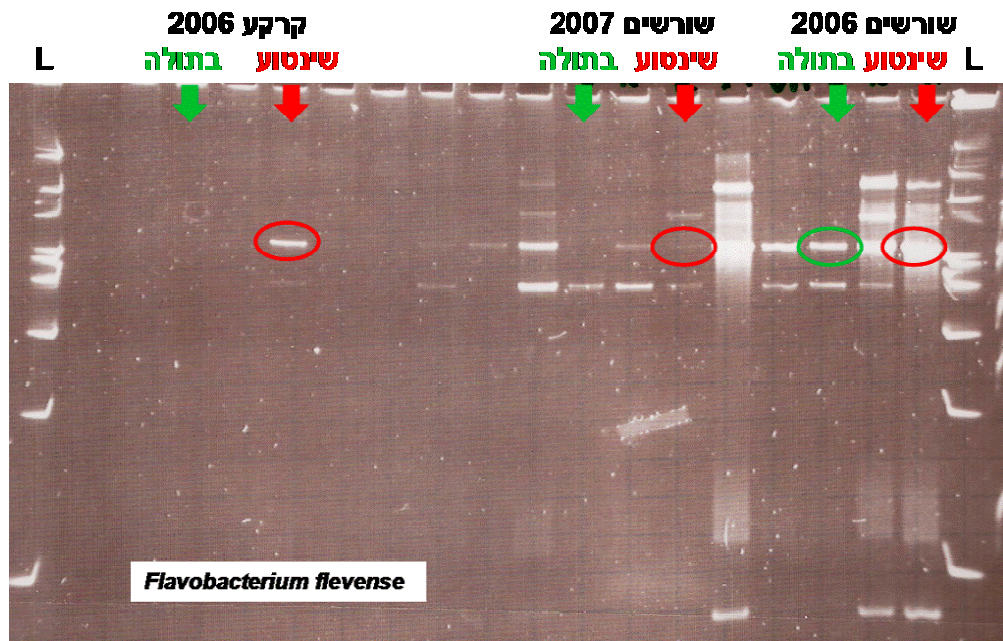


איור 7. תכנון פריימרים ספציפיים לחיידקים דיפרנציאליים.

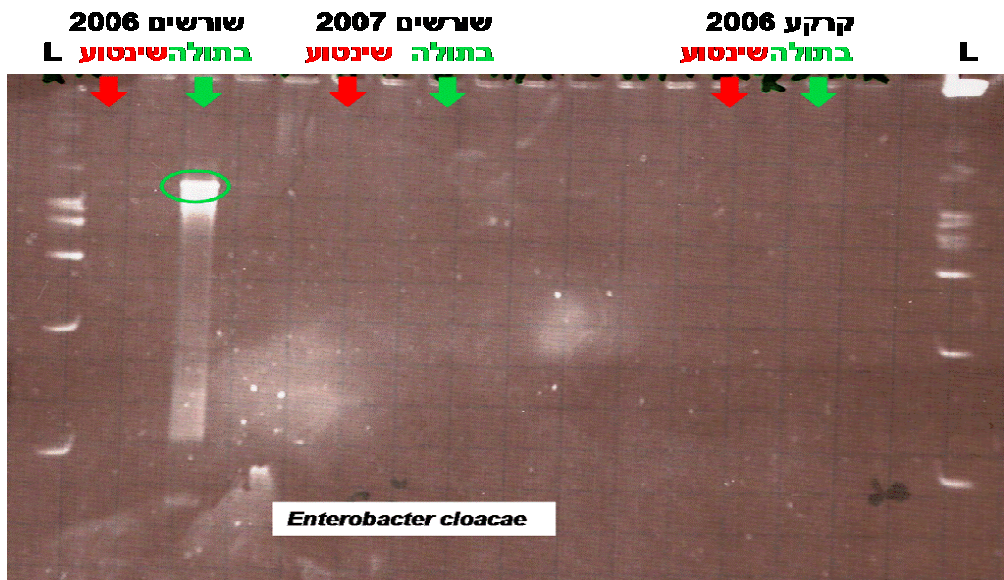
באיורים 8-10 מוצגת סריקה של דוגמאות מול שלושה מהפריימרים הספציפיים. בבדיקת נוכחות של *Flavobacterium flevense* (איור 8), לא חזרה על עצמה נוכחות דיפרנציאלית בדוגמאות שורשים מ 2006. לעומת זאת, נראתה נוכחות דיפרנציאלית בדוגמאות של הקרקע מ 2006. בבדיקת נוכחות של *Enterobacter cloacae* (איור 9) ניתן לראות נוכחות דיפרנציאלית בדוגמאות שורשים מ 2006 (מאשר את התוצאות שהתקבלו בפעם הראשונה). בנד זה לא הופיע בדוגמאות שורשים מ 2007 וגם לא בדוגמאות קרקע מ 2006. בבדיקת נוכחות של *Pseudomonas stutzeri* (איור 10) ניתן לראות שבנד זה הופיע בבירור ברוב החלקות הבתולות ולא במשונטעות. עוצמת ההבדלים הייתה שונה ומעניין לציין כי הנוכחות בקרקע הבתולה נראתה

נמוכה יחסית בכנות בהן לא נמדדו הבדלים משמעותיים או מובהקים בגדילה בין החלקה
הבתולה לבין המשונטעת (7-16, 8-17).

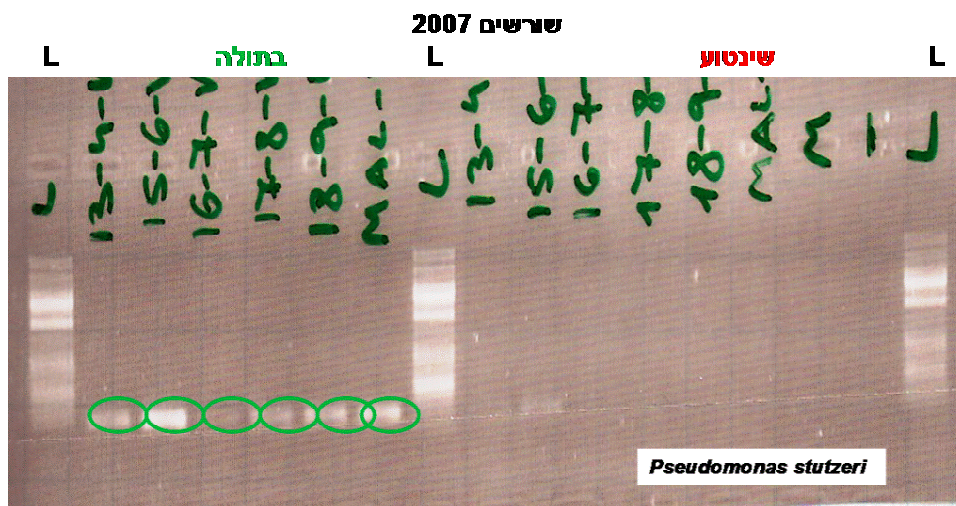
אנו ממשיכים בסריקת הדוגמאות משלוש פלטפורמות הניסוי.



איור 8. בדיקת נוכחות *Flavobacterium flevense* בדוגמאות DNA שהופקו משורשים ב 2006 ו 2007 ודוגמאות קרקע מ 2006 מהחלקה המשונטעת והבתולה בנהו יער.

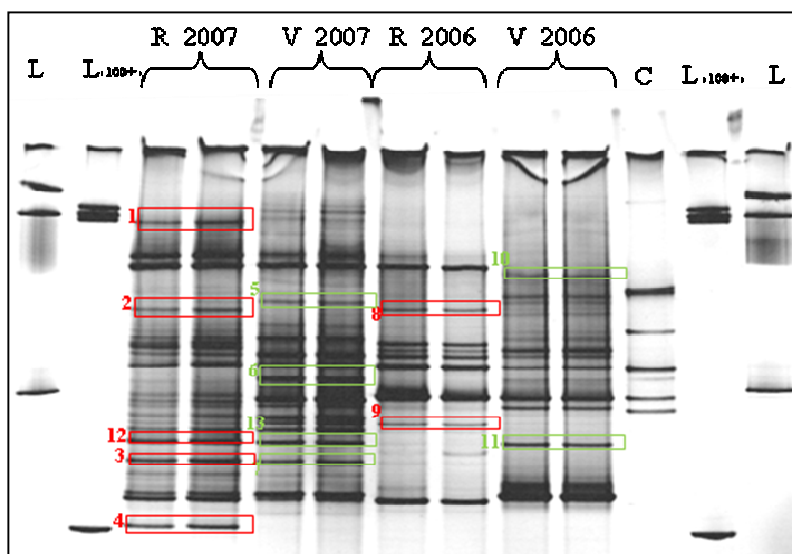


איור 9. בדיקת נוכחות *Enterobacter cloacae* בדוגמאות DNA שהופקו משורשים ב 2006 ו 2007 ודוגמאות קרקע מ 2006 מהחלקה המשונטעת והבתולה בנהו יער.



איור 10. בדיקת נוכחות *Pseudomonas stutzeri* בדוגמאות DNA שהופקו משורשים ב 2007 מהחלקה המשונטעת והבתולה בחוות מתיתיהו (כנות שונות).

בדו"ח הקודם דווח על בנדים דיפרנציאליים לפטריות וכן לחיידקי פסודומונס ולבצילוס, תוך שימוש בפריימרים ספציפיים. בשנת המחקר הנוכחית התמקדנו בבנדים הדיפרנציאליים של הפטריות אלא שהתברר שההבדלים שהתקבלו אינם חוזרים על עצמם. בשל כך נבדק פריימר אחר (במקום GC-ITS1) (GC-ITS5). בעזרת צירוף הפריימרים החדש נעשתה אנליזה חוזרת עבור דוגמאות DNA שהופקו מפני השורשים מעונות 2006 ו-2007 מהחלקה הבתולה (V) ומחלקת השינטוע (R) (נוה יער). תוצאות ההפרדה בעזרת DGGE מוצגות באיור 11. ניתן לראות הבדל גדול באוכלוסיות הפטריות על השורשים בין החלקה הבתולה (V) והחלקה המשונטעת (R) ובין העונות השונות. הבנדים הדיפרנציאליים (13 בנדים שונים) הופרדו מהגיל, והם כעת בהכנה לריצוף.



איור 11. גיל DGGE של אוכלוסיות פטריות משורשים של עצי תפוח מעונות 2006 ו-2007 מחלקה משונטעת (R) וחלקה בתולה (V) בנוה יער. הבנדים הדיפרנציאליים מסומנים באדום (הופיעו בחלקה המשונטעת אך לא בבתולה) או ירוק (הופיעו בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת).

4.2. דיגום עציצים

העציצים הוצבו ב 12 לנובמבר 2008 ונדגמו בזמן 0 ולאחר מכן מידי חודש (עד כה נאספו 3 דגימות). הדוגמאות כוללות כ 50 גרם קרקע (כ 25 גרם מכל עציץ, שני עציצים אשר אוחדו כחזרה אחת). בטיפולים עם שורשים נלקחה הקרקע אשר נמצאת במגע עם השורש וסביבתו (השורשים נוערו מעל המבחנה בה נאספה הדוגמאות). בטיפולים ללא שורשים נלקחה הקרקע מאותו עומק. הדוגמאות שימשו כאמור לבדיקת ציאנידים (נמצא מתחת לסף הגילוי של השיטה) וכן לבדיקת רעילות לחיידק רגיש לאנטיביוטיקה (לא נמצא רעיל). עד שלב כתיבת הדו"ח הופק DNA מהדוגמאות שנאספו עד כה. בהמשך העבודה מתוכננת סריקה של כלל הדוגמאות מול הפריימרים הספציפיים שהוכנו עד כה ויוכנו בהמשך עבור המינים הדיפרנציאליים שאותרו.

5. דיון, סיכום והשלכות על המשך המחקר

מחקר זה מתבסס על שימוש בטכנולוגיית DGGE לזיהוי מיקרואורגניזמים אשר עשויים להיות מעורבים בתופעת השינטוע. הגישה העומדת בבסיס העבודה היא השוואת תוצרי PCR מקרקע משונטעת לעומת קרקע שאינה משונטעת. ניכרים הבדלים סטטיסטיים בקצב הגדילה של העצים בחלקה המשונטעת והחלקה הבתולה בנוה יער וגם בחוות מתיתיהו. בנוסף, ניסוי העציצים שהועמד בשנת המחקר הנוכחית נועד ללמד על שינויים דינמיים החלים באוכלוסיית הקרקע לאחר העקירה ועל השפעה אפשרית שיש לשורשי העץ העקור על התפתחות האוכלוסיות. העבודה המולקולרית כללה השוואת בין אוכלוסיות מיקרואורגניזמים שהוגברו בעזרת פריימרים לחיידקים כלליים, אקטינומצטים, בצילוסים, פסודומונאסים ופטריות. עד כה רוצפו 6 בנדים דיפרנציאליים והתקבל הזיהוי של החיידקים הבאים: 1. *Flavobacterium flevense* - זוהה בחלקה המשונטעת אך לא בבתולה, 2. *Pseudomonas stutzeri* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת, 3. *Enterobacter cloacae* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת, 4. *Micrococcus luteus* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת, 5. *Kribbella sancallistae* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת, 6. *Streptomyces* - זוהה בחלקה הבתולה אך לא במשונטעת. העבודה הנוכחית מתמקדת במינים דיפרנציאליים של פטריות ובסריקה של כלל הדוגמאות מול פריימרים ספציפיים למינים הדיפרנציאליים שזוהו עד כה ושיזוהו בהמשך. מטרתו של הפרויקט הנוכחי היא לאתר סמנים מיקרוביאליים להופעת מחלת השינטוע ככלי לחיזוי עוצמת התופעה. בהמשך, אם יוכח כי המינים שאותרו הם אכן דיפרנציאליים עבור ספקטרום רחב של דוגמאות, יהיה צורך לבחון את משמעות מעורבותם במחלת השינטוע. למשל: האם אלו מינים הנמצאים רק בחלקות המשונטעות ומזיקים ישירות לעץ, או האם אלו מינים מועילים הנמצאים רק בחלקות הבתולות וחסרים בחלקות המשונטעות. להערכתנו, כדי לבחון שאלות יהיה כדאי לתכנן ניסויי עציצים מבוקרים בהם ניתן יהיה גם לבחון את יעילותם של שיטות עיקור סלקטיביות (כנגד מינים לא רצויים) או שיטות עידוד סלקטיביות (להתבססות מינים מועילים).

ככלל, התוצאות שהתקבלו עד כה מלמדות על סוגים שונים של מיקרואורגניזמים דיפרנציאליים, על כך שאוכלוסיות המיקרואורגניזמים בקרקע משתנות במהלך השנים ממועד הנטיעה וכן על הבדלים בין אוכלוסיות המיקרואורגניזמים בין חוות מתיתיהו לנוה יער. עדיין לא זוהו המיקרואורגניזמים הגורמים למחלה.