

Darwin Initiative: Half Year Report
(due 31 October 2008)

Project Ref. No.	15/004
Project Title	Conserving and using entomopathogenic fungi and nematodes within Chile
Country(ies)	UK and Chile
UK Organisation	CABI, Europe-UK, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY
Collaborator(s)	Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Avenida Vicente Méndez 515, Chillán, VIII Región, Chile
Project Leader	Dr. Dave Moore
Report date	October, 2008
Report No. (HYR 1/2/3/4)	HYR 3
Project websites	http://www.cabi.org/ProjectsDetail.asp?ProjectID=307 http://www.controlbiologicochile.cl/content/view/32/130/

1. Outline progress over the last 6 months (April – September) against the agreed baseline timetable for the project.

Originally, six ecologically distinct areas for surveying were selected by the project team; five were surveyed in Y1 and Y2, the final site, the Atacama Desert (22- 24 °S, 67 – 69 °W) was surveyed in this present reporting period. The sampling was based around a diverse array of habitats within the survey site, generally omitting agricultural land, but seeking out wet areas for many samples. The team collected 100+ samples from a range of habitats including soils of extreme aridity and/or high salinity and from the edge of thermal springs. Molecular identification of isolates from these samples has so far identified 42 isolates of EPF (Appendix 1, Table 1) and 1 EPN (*Heterorhabditis* sp. from 2500m above sea level).

The project team at CABI has been working through the EPN on an ongoing basis. Molecular characterisation of the EPNs from survey site 6 (Chile far south, including Tierra del Fuego) has identified twelve isolates of *Steinernema feltiae* together with at least one unknown species. Of particular interest is the apparent widespread distribution and occurrence of EPN in this area, the highest of all the survey sites. This unexpected high number of 'positive EPN hits' could indicate EPN adaptation to the more extreme environments as survey site 6 is in Chile's subpolar far south region.

A full description of a new EPN species, discovered in survey site 5, was completed and the description has been submitted to *Nematology* (confidential proof provided as attachment – see Appendix 1, Figure 1). Furthermore, as part of a PhD thesis at the University of Reading, this new EPN is being studied in greater detail, particularly for a variety of biological characteristics of value when considering biological control potential. This EPN has good parasitic abilities against a number of key pests of Chile crops, together with a fast mode of action and relatively high tolerance to moist and cold conditions.

INIA has been investigating the population genetics of the principle EPF isolates obtained from the six survey sites (namely *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*), using Simple Sequence Repeats (SSR) (or microsatellites). Microsatellites are powerful molecular markers containing high levels of genetic information, and will provide information on genetic association and gene flow between isolates, offering an insight into spatial dynamics and habitat fragmentation within Chile. One hundred and twenty isolates of *B. bassiana* and 127 isolates of *M. anisopliae* have been analysed by a set of 8 and 12 SSR primers respectively. The results are being analysed with the appropriate software for each EPF species. Genetic diversity has

been observed, with full results available by end Y3.

Agronomy students at INIA have continued to look in detail at the biology of a number of EPF and EPN isolates collected during the project (see Appendix 2, Table 1 for six projects underway during present reporting period), full results of which will be provided in the Y3 annual report. The results of the studies will be catalogued on a database which accompanies the EPF and EPN collections at INIA.

Tables and figures in Appendix 2 illustrate the dissemination of project outputs during this reporting period, including a number of seminars and workshop given by Darwin project staff regarding EPF and EPN (Table 2) and a recent article in a Chilean newspaper detailing the project work (Figure 1). Information on the Project is incorporated into a new website: <http://www.controlbiologicochile.cl/content/view/32/130/>.

2. Give details of any notable problems or unexpected developments that the project has encountered over the last 6 months. Explain what impact these could have on the project and whether the changes will affect the budget and timetable of project activities.

We have been pleased with the large number of isolates found, but they have resulted in considerable extra work, which both INIA and CABI have carried out additional to plan. Molecular characterisation of EPN just determines whether an isolate is a new species or not, a full description has been done for one new species which has involved light and scanning microscopy, drawings and measurements, involving a time input in excess of that budgeted. It is likely that between 2-6 new EPN species will be discovered in the project but it will be impossible to describe them all fully.

The large number of isolates improves the chances of useful isolates being found for later commercialisation. There are no implications for the budget or timetable.

Have any of these issues been discussed with the Darwin Secretariat and if so, have changes been made to the original agreement?

Not applicable

Discussed with the DI Secretariat: not applicable in..... (month/yr)

Changes to the project schedule/workplan: not applicable in.....(month/yr)

3. Are there any other issues you wish to raise relating to the project or to Darwin's management, monitoring, or financial procedures?

no

If you were asked to provide a response to this year's annual report review with your next half year report, please attach your response to this document.

Please note: Any planned modifications to your project schedule/workplan or budget should not be discussed in this report but raised with the Darwin Secretariat directly.

Please send your **completed form email** to Eilidh Young, Darwin Initiative M&E Programme at Darwin-Projects@ectf-ed.org.uk . The report should be between 1-2 pages maximum. **Please state your project reference number in the header of your email message eg Subject: 14-075 Darwin Half Year Report**

Conserving and using entomopathogenic fungi and nematodes within Chile.

Appendix 1. Table 1. Entomopathogenic fungi Isolates found from survey site 1, the Atacama Desert.

T2	1	02-Abr-08	S22	20	27,1	68	39	14,2	2525	Entrada a Chiu chiu	II	Metarhizium
T2	5	02-Abr-08	S22	21	9,8	68	39	31,3	2525	Parte baja de acequia de riego ,Chiu chiu	II	Metarhizium
T2	6	02-Abr-08	S22	22	16,2	68	39	20,5	2509	Arbustoa cola de zorro, Chiu chiu	II	Metarhizium
T2	8	02-Abr-08	S22	22	15	68	39	19,4	2509	Borde alto de río Las Juntas, Chiu chiu	II	Metarhizium
T2	12	02-Abr-08	S22	9	4,7	68	38	11,6	2838	Desierto, arbustos, Lazana	II	Metarhizium
T2	13	02-Abr-08	S22	1	18,9	68	37	17,3	3019	Borde laguna Condri	II	Metarhizium
T2	14	02-Abr-08	S22	20	16,6	68	39	9,8	2536	Río Loa Chiu chiu Húmedo	II	Metarhizium
T2	24	02-Abr-08	S21	43	37,1	68	16	38,4	3967	Ladera de cerro con Llaretá	II	Metarhizium
T2	26	03-Abr-08	S22	40	8,1	68	31	0,9	3028	Camino Calama San Pedro huerto regado	II	Metarhizium
T2	27	04-Abr-08	S22	19	49,6	68	0	0,8	4266	Orilla de laguna frío y húmedo	II	Metarhizium
T2	30	03-Abr-08	S22	46	21,8	68	22	52,9	3267	Cordillera de Barros Arana arbusto	II	Metarhizium
T2	32	03-Abr-08	S22	53	25,1	68	12	50,4	2467	Ladera bajo arbusto Puente Pukara Quitar	II	Metarhizium
T2	34	03-Abr-08	S22	53	25,1	68	12	50,4	2467	Bajo río arenoso Puente Pukara Quitar	II	Metarhizium
T2	42	03-Abr-08	S22	50	17	68	12	7,1	2534	Orilla de río San Pedro puente Catarpe	II	Metarhizium
T2	44	03-Abr-08	S22	51	31,9	68	13	5	2503	Orilla de río San Pedro Salida garganta del diablo	II	Metarhizium
T2	45	03-Abr-08	S22	51	31,9	68	13	5	2503	2m de río San Pedro Salida garganta del diablo	II	Metarhizium
T2	47	04-Abr-08	S22	56	35,1	68	10	35,7	2389	Bajo Cachiyuyo, sector de inundación esporádica	II	Metarhizium
T2	53	04-Abr-08	S23	11	20,1	67	59	38,4	2493	Orilla de río muy húmedo	II	Metarhizium
T2	55	04-Abr-08	S23	11	16,6	67	59	31,6	2498	Bajo Tamarugo suelo muy húmedo	II	Metarhizium
T2	58	04-Abr-08	S23	11	13,9	67	59	28,4	2500	Bajo guano de burro	II	Metarhizium
T2	59	04-Abr-08	S23	11	15,3	67	59	29	2505	Orilla de canal de riego suelo muy seco	II	Metarhizium
T2	63	04-Abr-08	S23	29	41,4	67	59	17,2	2585	Vertiente sector inundado con agua dulce	II	Paecilomyces
T2	65	04-Abr-08	S23	29	41,6	67	59	17,4	2587	Vertiente sector inundado sobre borde húmedo	II	Paecilomyces
T2	69	04-Abr-08	S23	35	40,4	67	53	16	3276	Terrazas Socaire Bajo maíz	II	Metarhizium
T2	72	04-Abr-08	S23	36	48,7	67	51	24,7	3564	Orilla de acequia de riego Socaire	II	Metarhizium
T2	76	05-Abr-08	S32	56	38,4	WO71	5	5,2	484	Orilla de acequia de riego Socaire	II	Metarhizium
T2	78	04-Abr-08	S23	17	15,7	67	59	46,3	2463	Bajo atriplex atacamensis	II	Metarhizium
T2	79	05-Abr-08	S22	55	3,3	67	53	34,7	3885	Bajo chachacoma camino al paso Jama	II	Beauveria
T2	80	05-Abr-08	S22	55	35,9	67	51	12,7	4262	Bajo coirón camino paso Jama	II	Paecilomyces
T2	81	06-Abr-08	22	49	3,7	68	7	10,7	2903	Bajo Chachacoma acumulación de agua	II	Metarhizium
T2	86	05-Abr-08	S22	32	13,1	68	2	15,1	4245	Laguna Saciel orilla bajo gramínea	II	Beauveria
T2	87	05-Abr-08	S22	32	12,3	68	2	14,9	4245	Laguna Saciel orilla 2 m	II	Beauveria
T2	89	05-Abr-08	S22	32	13	68	2	15,1	4246	Laguna Saciel orilla 10 m	II	Beauveria
T2	95	05-Abr-08	S22	35	32,1	68	3	20,6	4074	Estero bajada a Machuca húmedo rico en materia orgánica	II	Beauveria
T2	97	05-Abr-08	S22	35	32,2	68	3	20,1	4073	Estero bajada a Machuca borde húmedo	II	Beauveria
T2	100	05-Abr-08	S22	44	56	68	4	16,8	3258	Camino a Machuca orilla de río, bajo planta sector seco	II	Beauveria
T2	102	06-Abr-08	S22	19	47,1	68	0	30,6	4249	Planta cerca de geiser baja temperatura, El Tatío	II	Beauveria
T2	108	06-Abr-08	S22	19	39,2	68	0	0,2	4364	Bajo coirón suelo frío	II	Beauveria
T2	110	06-Abr-08	S22	19	49,4	68	0	0,4	4269	Bajo coirón suelo húmedo	II	Beauveria
T2	111	06-Abr-08	S22	19	49,5	68	0	42	4271	Bajo coirón suelo seco y frío	II	Beauveria
T2	113	06-Abr-08	S22	25	0,6	68	10	29,4	3788	Bajo Chachacoma suelo quemado	II	Beauveria
T2	116	06-Abr-08	S22	20	14,9	68	12	37,9	3250	Lecho de río Caspana bajo cola de zorro	II	Beauveria

Appendix 1, Figure 1. Title page of paper submitted on a new species of entomopathogenic nematode, with features under light microscope

***XXX* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new
entomopathogenic nematode from Isla Magdalena, Chile**

Steve EDGINGTON^{1,*}, Alan G. BUDDIE¹, Lukasz TYMO¹, David J. HUNT¹, Khuong B.
NGUYEN², Andrés I. FRANCE³, Loreto M. MERINO³ and Dave MOORE¹

¹ *CABI Europe-UK, Bakeham Lane, Egham, Surrey, TW20 9TY, UK*

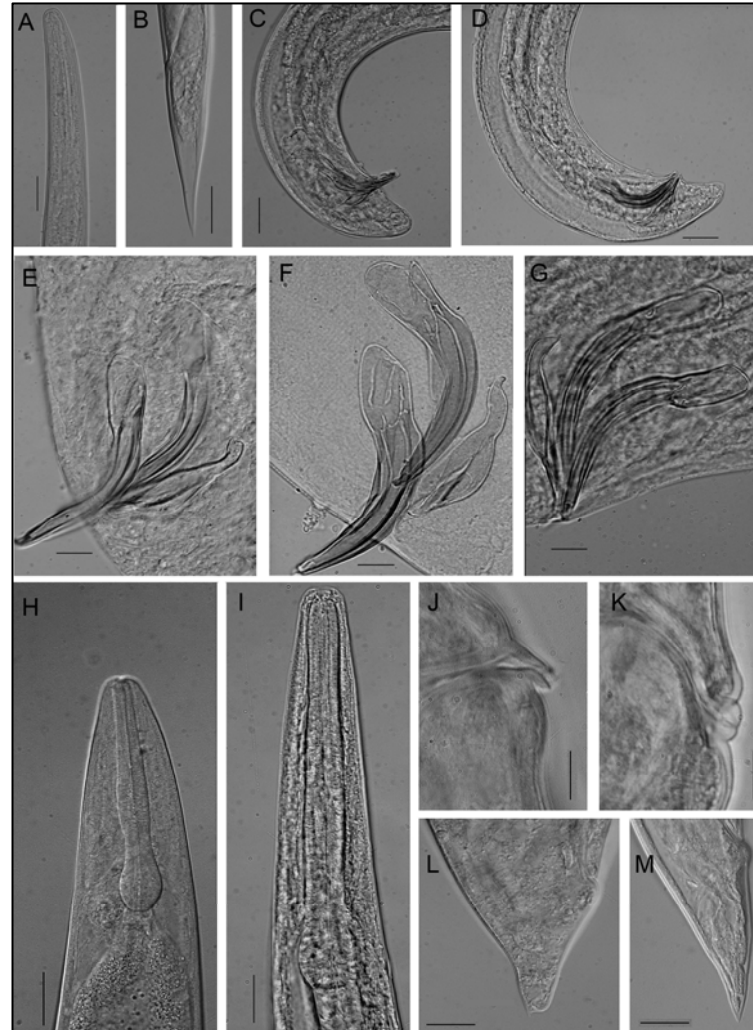
² *University of Florida, Gainesville, FL 32611-0620, USA*

³ *Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Avenida Vicente Méndez, Casilla
426, Chillán, Chile*

Received: 2008; revised: 2008

Accepted for publication:

* Corresponding author, e-mail: s.edgington@cabi.org



Appendix 2. Further dissemination outputs

Table 1. Student projects on EPF and EPN isolates

Title of thesis	Student name	University
Evaluación de hongos entomopatógenos colectados en el sur de Chile para el control de <i>Otiorhynchus sulcatus</i> . (Coleoptera: Curculionidae). [Evaluation of EPF against the curculio <i>Otiorhynchus sulcatus</i>].	Claudia Inostroza	Universidad de Concepción
Selección de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos para el control del escarabajo de la corteza <i>Hylurgus ligniperda</i> . [Selection of native isolates of EPF to control the bark beetle <i>Hylurgus ligniperda</i>].	Karen Parra	Universidad ARSIS, Santiago
Control biológico de larvas de cuncunilla negra de las praderas <i>Dalaca pallens</i> (Lepidoptera; Hepialidae) con nemátodos entomopatógenos. [Biological control of pasture black weevil <i>Dalaca pallens</i> with native EPN].	Alexis Maldonado	Universidad de Concepción
Elección de aislamientos nativos de nematodos patogénicos, para el control de la polilla de la manzana <i>Cydia pomonella</i> . [Selection of native isolates of EPN to control the apple moth <i>Cydia pomonella</i>].	Manuel Contreras	Universidad de Concepción
Estudio de aspectos ecológicos de forrajeo y dispersión de un aislamientos nematodo entomopatógeno nativos de Chile. [Parasitic and movement behaviour of native isolates of EPN].	Alejandro Ortíz	Universidad de Concepción
Evaluación del efecto de la temperatura sobre patogenicidad y aspectos reproductivo de nemátodos nativos de Chile. [Temperature effect on pathogenicity and reproduction of Chilean EPN].	Cristian Acuña Vega	Universidad de Talca

Table 2. Outputs dissemination by project staff during the present reporting period

Location	Participants	Date
Symposium on microbial insect pathogens, XXIII International Congress of Entomology, South Africa (S. Edgington)	approximately 40	July 2008
"Conserving and using of entomopathogenic nematodes whiting Chile" Course in Agronomy, Universidad de Concepción de Chile (A. France)	Undergraduate	15-8-2008
"Nematodes and fungi from Chile" Course in Agronomy, Universidad San Sebastian Chile (A. France)	Undergraduate	29-8-2008
"Biological control". Meeting of local farmers of La Araucanía, IX Región (L. Merino)	Small-holders	8-8-2008
Entomopathogenic nematodes and biological control. Seminar on biological control (L. Merino)	Farmers and researchers	15-8-2008
Meeting of local organic farmers from the Bio Bio Region (L. Merino)	Small-holders	25-9-2008
Chilean agronomical Congress, La Serena, Chile (L. Merino)	200 researchers	4 - 7-10-2008

14
Ciencia
El Diario de Concepción
Domingo 15 de junio de 2008



Xp!xp!xp!xp!
Larva de la polilla de la manzana (*Cydia pomonella*) parasitada por nemátodos entomopatógenos. Esta es una plaga cuarentenaria, es decir, su presencia es restrictiva para las exportaciones de frutas.



Xp!xp!xp!xp!
El gorgojo de la frutilla (*Otiorhynchus sulcatus*), es considerada una plaga cuarentenaria para mercados de Europa y Norteamérica. Las larvas de este insecto anidan las raíces principales provocando la muerte de la planta.



Xp!xp!xp!xp!
Larva de la polilla de la cera (*Galleria mellonella*) utilizada para multiplicar aislamientos de nemátodos entomopatógenos por medio de la inoculación a través del sistema denominado "in vivo".

COLECCIÓN DE ENTOMOPATÓGENOS GUARDA HONGOS DESAPARECIDOS DE CHAITÉN.

Hongos y gusanos, pesticidas del futuro

El Instituto de Investigación Agropecuaria de Chillán con la cooperación de la Fundación Darwin financiaron la recolección de más de mil hongos y nemátodos que podrían desplazar a los químicos.

Redacción El Diario

Concentrados a -196 grados permanece una colección de más de mil hongos y nemátodos (gusanos) que el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria con sede en Chillán, Inia Quilmapu y la fundación Darwin Initiative, dependiente de Deira UK, recolectaron para el desarrollo de sistemas de control biológico. Se trata de un proyecto para el que recientemente los británicos aportaron 500 mil libras y que podría desplazar a los químicos aplicados en los cultivos de frutas y hortalizas.

La ingeniero agrónomo peruquista, Loreto Merino Marchivello, es parte del equipo de investigadores a cargo de esta iniciativa. "La idea central es cosechar los microorganismos entomopatógenos (entomo-insectos), hongos y nemátodos en este caso, identificar su especie y sus características como agentes de control. También preservar el patrimonio ecológico y la biodiversidad de estos organismos".

La colección cuenta con 1075 aislamientos de hongos y 300 aislamientos de nemátodos recolectados en todo el país, en lugares como San Pedro de Atacama, el parque Nacional La Campana, Parque Nacional de Nahuelbuta, Punta Lavapié, Monumento Nacional de Conchalmo y Salto de El Laja. También en tierras más australes como Coyhaique, la Patagonia, Tierra del Fuego y en territorios insulares como la Isla Magdalena, en la décima región.

ning en los que son aplicados a larvas y adultos de insectos plagas para determinar cuál de ellos tiene el mayor nivel de manejo de la plaga. "Los entomopatógenos sólo se seleccionan al insecto dafino y no perjudican a otros insectos nativos buenos", aclaró la profesional.

Estudios de Inia demuestran también la existencia de cepas de hongos que controlan insectos plagas de importancia económica en la zona Centro-Sur y Sur de Chile. Entre ellos el chape del cerezo, capachito de los frutales, polchito

sobre el tiempo de efectividad del mecanismo, la agrónoma admitió que depende de la plaga y del agente entomopatógeno. "En el caso de los nemátodos son rápidos en buscar y matar y lo hacen entre 48 a 72 horas. Los hongos son más lentos porque trabajan en forma de esporas que son inmóviles, pero que se establecen en el suelo de forma más permanentes.

Si bien este método se encuentra todavía en etapa de investigación, los resultados indican que las posibilidades de desplazar a los químicos en el tratamiento de los cultivos son cada vez más cercanas. Aún así, existe una serie de mediciones y organismos que deben intervenir antes de su explotación comercial.

Chaitén congelado

Un aspecto interesante de esta investigación habla del trabajo realizado en Chaitén poco antes de la erupción del volcán.

Según Inia Quilmapu, existen por lo menos 15 aislamientos provenientes de Chaitén, Futaleufú y de la ladera del volcán Llaima, lugares

"Una vez que sabemos que tiene potencial como agente de control biológico se realizan estudios de modificación y se entregan los resultados al Centro tecnológico de control biológico, que cuenta con empresas asociadas las que se encargan de la comercialización, principalmente de los hongos", detalló la agrónoma.

Hay al menos 15 aislamientos de Chaitén, Futaleufú y la ladera del Llaima.

que posteriormente sufrieron el embate de las cenizas y las inundaciones. "No sabemos si estos hongos y nemátodos aún existen en condiciones naturales, pero si están guardados en frío (criopreservación) y conservados. Algunos de estos hongos tienen un importante potencial como agentes de manejo de plagas", concluyó la investigadora.

“ Este método no perjudica a insectos nativos o buenos”.

Loreto Merino, ingeniero agrónomo de Inia Quilmapu.

Procedimiento

Una vez recolectadas las muestras son sometidas a pruebas o screening, gorgojo de la frutilla, araña chaqueta amarilla, la polilla del beote del pino.



INVESTIGADORES DE INIA. Quilmapu recolectando muestras de suelo en el sector cordillero de Chillán. A la izquierda, Loreto Merino.



CHAQUETA AMARILLA parasitada por el hongo *Beauveria bassiana*.

Half Year Report Format October 2008

7