

Temperatura base *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz aislado de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass en Michoacán, México

In vitro base temperature of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz isolated from avocado (*Persea americana* Mill.) fruits cv. Hass in Michoacán, México

José Luciano MORALES GARCÍA¹, María del Pilar RODRÍGUEZ GUZMÁN², Hilda Susana AZPÍROZ RIVERO³ y Martha Elena PEDRAZA SANTOS¹

¹Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México, ²Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Especialidad en Fitopatología. 56230, Montecillo, Texcoco, México y ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Valle de México. km 18,5 Carretera Los Reyes-Lechería, Chapingo, Texcoco, México. E-mails: jluciano@umich.mx y jluciano@prodigy.net.mx ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 31/01/2009
Primera revisión recibida: 11/08/2009

Fin de primer arbitraje: 13/03/2009
Aceptado: 12/08/2009

RESUMEN

Entre los factores fitopatológicos que más limitan la exportación, se encuentran la antracnosis y la roña, distribuidas en todos los municipios de Michoacán, México, donde se cultiva aguacate. El objetivo fue determinar la temperatura base a partir de la cual se desarrolla el hongo *C. gloeosporioides* bajo condiciones de laboratorio y su relación con las infecciones que se presentan en frutos de aguacate en el campo. Los cultivos monoconidiales se derivaron de aislamientos de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis, colectados en diferentes municipios e incubados a 4, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 18, 24, 27, 30 y 40 °C. Se seleccionaron cinco frutos, en cada uno se registró el número de infecciones nuevas. La temperatura base de *Colletotrichum gloeosporioides* cultivado en PDA fue de 8°C (tasa de crecimiento $r = 0,015$), su desarrollo óptimo fue a 24°C ($r = 0,24$) seguido de 16 y 18°C ($r = 0,18$) y 27°C ($r = 0,17$). El hongo no creció a 4 y 40 °C. En campo no hubo lesiones en frutos cuando la temperatura media fue inferior a los 14 °C, lo mismo ocurrió cuando la temperatura rebasó los 18,9 °C. También se pudo observar que a temperaturas medias mayores de 15°C el número de lesiones aumentó y entre 15,4 y 17,9 °C se presentó el mayor número de lesiones.

Palabras clave: Hongo, tasa de crecimiento, antracnosis

ABSTRACT

Among the phytopathological factors constraining export are anthracnose and scab, distributed in all municipalities in Michoacan, Mexico, where avocados are grown. The objective was to determine the base temperature from which the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* develops under laboratory conditions and its relationship to infections occurring in avocado fruits in the field. Monoconidial cultures were derived from isolates of avocado fruits with anthracnose symptoms, collected in different municipalities and incubated at 4, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 18, 24, 27, 30 and 40 °C. Five fruits were selected and the number of new infections was recorded in each fruit. The base temperature of *C. gloeosporioides* grown on PDA was 8 °C (growth rate, $r = 0.015$), its optimum grow was at 24 °C ($r = 0.24$) followed by 16 and 18 °C ($r = 0.18$) and 27 °C ($r = 0.17$). Fungus did not grow at 4 and 40 °C. In the field, there were no fruit injuries when the mean temperature was below 14 °C, the same happened when the temperature exceeded 18.9 °C. It was also observed that mean temperatures over 15 °C increased the number of injuries and between 15.4 and 17.9 °C showed the greatest number of injuries.

Key words: Fungus, growth rate, anthracnose

INTRODUCCIÓN

Entre los factores fitopatológicos que más limitan la exportación, se encuentran la antracnosis y la roña, distribuidas en todos los municipios de Michoacán, México, donde se cultiva aguacate (USDA, 1997; Lázaro, 1985; Morales y Vidales, 1994; Téliz, 1999).

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* afecta al fruto en cualquier etapa de su desarrollo, traslado, almacenaje y comercialización. Una humedad relativa de 85-90%, temperaturas de 18-25°C en campo, y la falta de aereación en los huertos favorecen la infección (Morales, 1997). En muchos de los modelos de predicción que se utilizan en epidemiología se pronostica la incidencia o severidad

de la enfermedad usando un índice que incluye variables ambientales como temperatura, lluvia, humedad relativa y humedad sobre las hojas. Debido al efecto determinante que tiene la temperatura en el desarrollo de las plantas y en organismos poiquilotérmicos, una forma de medir ese tiempo fisiológico es con días grado (DG), en los cuales el efecto de la temperatura que se acumula a través del tiempo supera a algún valor mínimo. El uso de los días-grado requiere partir de la suposición de que la temperatura es el factor determinante de la tasa de crecimiento del organismo bajo estudio.

Los umbrales inferior y superior para el desarrollo de una especie son dos parámetros base para determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y desarrollo de los organismos (Wilson y Barnett, 1983). Por esta razón es de gran importancia la determinación de la temperatura base del cultivo y/o del patógeno en estudio epidemiológico (Dieckmann, 1992). Un ejemplo de este aspecto es el modelo basado en los días grado que se desarrolló para predecir la aparición de las primeras lesiones de tizón temprano (*Alternaria solani*) en follaje de papa en dos áreas productoras en Colorado, E.U.A. El modelo, basado en la acumulación de días grados arriba de 7,2°C (temperatura base) a partir de la fecha de plantación, predijo efectivamente el comienzo de la dispersión secundaria del patógeno. Los días-grado-centígrados acumulados requeridos para la aparición de las primeras lesiones de tizón temprano fueron 361 DG en el Valle de San Luis, un valle de altas montañas, y de 625 DG en el noroeste de Colorado en un área con elevaciones bajas. Los granjeros usaron la información de DG para programar el inicio de la aplicación de fungicidas y para minimizar los costos del control del tizón temprano de la papa (Franc *et al.*, 1988).

Dos modelos basados en el cálculo de días grados se desarrollaron para predecir la aparición en la primavera de la primera infección sistémica de *Pseudoperonospora humili* en retoños de lúpulo (*Humulus lupulus* L), en plantaciones comerciales de grupos de cultivares en el Valle Yakima de Washington. Uno de los modelos se basó en el total de días-grado acumulados cuando la temperatura ambiental estaba sobre 6.5 °C. Un segundo modelo se desarrolló considerando la misma temperatura (6.5°C), pero del suelo; ambos modelos predijeron efectivamente la emergencia de los primeros retoños de lúpulos infectados sistemáticamente (Coakley *et al.*, 1985).

El objetivo fue determinar la temperatura base a partir de la cual se desarrolla el hongo *C. gloeosporioides* bajo condiciones de laboratorio y su relación con las infecciones que se presentan en frutos de aguacate en el campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colletotrichum gloeosporioides se aisló en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis. Cinco cultivos monoconidiales se seleccionaron por su color y velocidad de crecimiento. Las cápsulas de Petri con cada uno de los cinco monoconidiales se incubaron a 13 diferentes temperaturas: 4, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 18, 24, 27, 30 y 40°C. El crecimiento del hongo se midió diariamente hasta que la colonia completó el tamaño de la cápsula; el experimento terminó a los 18 días. Los datos de crecimiento total del micelio (cm) se analizaron mediante un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados. Estos datos en proporción se transformaron por medio de logaritmos naturales (ln) para ajustarse a tres modelos de crecimiento tipo sigmoidal y no flexibles: monomolecular, logístico y gompertz en su forma linealizada (Madden, 1980). El modelo se seleccionó en base a los parámetros estadísticos R^2 , CME, probabilidad del modelo, $>\hat{S}_{\beta_0}$, $>\hat{S}_{\beta_1}$ y comportamiento de residuales.

Posteriormente, se procedió a homologar todas las tasas de crecimiento al modelo monomolecular debido a que la mayoría de las curvas se ajustaron a este modelo, para ello se utilizó el parámetro Rho (tasa absoluta media ponderada) el cual permitió encontrar las tasas (r) equivalentes. Luego estas se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de separación múltiple de medias de Tukey con la finalidad de definir su significación.

La homologación de las tasas de crecimiento se realizó a través de parámetro Rho (ρ) (Richards, 1959; Campbell y Madden, 1990):

$$\text{Rho} = \frac{r}{((mx2) + 2)}$$

Donde: r = tasa de cambio de cada modelo, m = 0 para el modelo Monomolecular, m = 1 para el modelo de Gompertz, m = 2 para el modelo Logístico.

Para encontrar la tasa de cambio equivalente de cada modelo, se despejó *r* de la fórmula anterior:

$$Rho = \frac{r}{((mx2) + 2)}$$

$$((mx2) + 2) \cdot (Rho) = r$$

Por lo tanto: $r_M = ((mx2) + 2) \cdot (Rho)$

En un huerto de aguacate ubicado en San Juan Nuevo, Michoacán, se seleccionaron cuatro árboles, de cada uno de ellos se seleccionaron cinco frutos al azar por cada uno de los puntos cardinales (20 frutos/árbol), colocándoles una cinta de plástico para identificar al fruto con un número y registrar la ubicación del árbol y del fruto en el árbol. De cada fruto se registró el número de infecciones nuevas marcándolas con un marcador rojo indeleble a fin de no confundirlas con las que aparecerían en el siguiente muestreo. En dicho huerto se colocó una estación climática automatizada (Weather Monitor II - Davis Instruments), la cual se programó para monitorear el ambiente cada hora y registrar las medias diarias. Las variables climáticas registradas fueron temperatura máxima, media y mínima, precipitación, velocidad y dirección del viento. Para fines de este estudio se usaron las medias mensuales de las variables climatológicas. El monitoreo de *C. gloeosporioides* se realizó usando una trampa volumétrica de esporas con registro para siete días, ubicándola en medio de cuatro árboles y cerca de una fuente de corriente eléctrica (Gadoury and MacHardy, 1983 modificada por Morales, 1996). Las esporas se capturaron en una mica adherible de 50 cm de largo y 3,0 cm de ancho y se cuantificaron bajo el microscopio de luz, examinando al azar 1cm² por día. La densidad de esporas se midió una semana por mes durante dos años. La temperatura máxima, media, mínima, número de lesiones y liberación de esporas se analizaron mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados con la finalidad de determinar cual temperatura influía en la liberación de esporas y en la formación de lesiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La temperatura mínima de crecimiento de *C. gloeosporioides* en medio de cultivo PDA fue de 8 °C (tasa de crecimiento *r* = 0,015). El hongo creció 1 mm al cuarto día después de haber sido sembrado a 7 °C, y no mostró ningún desarrollo después; a 8 °C mantuvo un crecimiento lento pero constante. La

mayor tasa de desarrollo (*r* = 0,24) fue a 24°C seguido de 16°C y 18°C (*r* = 0,18), y de 27°C (*r* = 0,17). El hongo no creció a 4°C y 40°C (Figura 1). A 24°C uno de los cinco monoconidiales cubrió la cápsula, lo cual sucedió a los nueve días y en ese momento se determinó el promedio para los cinco monoconidiales; el mismo procedimiento se siguió para todas las temperaturas. A 18°C el hongo cubrió la cápsula los 12 días; a 16°C y 27°C fue a los 13 días, mientras que a 30°C el hongo no logró llenar la cápsula. De los aislamientos que se colocaron a temperaturas de 16, 18, 24 y 27°C al menos uno de los monoconidiales llenó la cápsula, mientras que el resto a pesar de que se dejaron hasta 18 días, no lo hicieron (Figura 2 y Cuadro 1).

Los cinco monoconidiales de *C. gloeosporioides* mostraron variaciones de crecimiento a la misma temperatura, aún cuando se trata de la misma especie pero aislados de diferentes localidades del estado de Michoacán; se observó consistencia en el aislamiento MC 42 como el más rápido y el MC 5

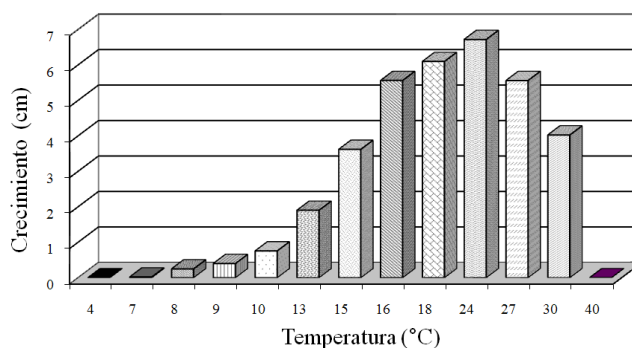


Figura 1. Crecimiento promedio *in vitro* de cinco aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a 13 temperaturas.

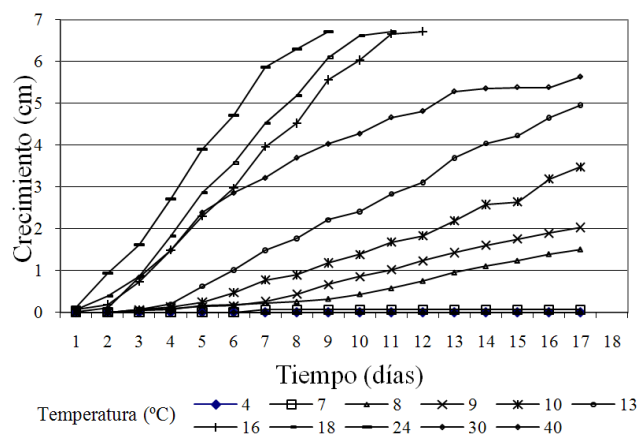


Figura 2. Crecimiento medio acumulado de cinco cultivos monoconidiales de *Colletotrichum gloeosporioides* en medio de cultivo PDA a 13 temperaturas.

como el de más lento crecimiento en cada una de las cuatro temperaturas contrastantes (Figura 3).

El análisis temporal de las curvas de crecimiento de los cinco aislamientos monoconidiales del hongo a 13 temperaturas en medio de cultivo PDA dio como resultado que de los 65 cultivos, 43 tuvieron un ajuste estadístico con el modelo Monomolecular, correspondiendo principalmente a las temperaturas de 7, 8, 9, 10, 13 y 30°C; 16 se ajustaron al modelo Gompertz y correspondieron a las repeticiones bajo las temperaturas de 15, 16, 18, 24, 27 y 30°C; y 6 se ajustaron al modelo Logístico, correspondiendo a temperaturas de 15, 16, 24 y 27°C. Unas curvas de crecimiento de algunos de los monoconidiales expuestos a 15, 16, 24 y 27°C se ajustaron al modelo Gompertz y otras al Logístico. Para comparar las tasas de crecimiento de los modelos seleccionados todas las tasas se homologaron a un solo modelo, el más frecuente que en este caso fue el Monomolecular. Las tasas de crecimiento no se pueden comparar directamente si corresponden a diferentes modelos, debido a que esto daría resultados imprecisos (Kranz, 1974). El modelo monomolecular fue el que mejor explicó el comportamiento de la mayoría de las curvas obtenidas.

Cuadro 1. Tasa promedio de crecimiento (r_M) de cinco monoconidiales de *Colletotrichum gloeosporioides* a 13 temperaturas en medio de cultivo PDA y días que el hongo tardó en cubrir el área de una caja Petri.

Temperatura (°C)	Tasa de Crecimiento (R_m)	Tiempo (Días en cubrir la cápsula)
4	0,0	-
7	0,0006	-
8	0,0153	+18
9	0,0799	+18
10	0,0745	+18
13	0,0726	+18
15	0,1397	+18
16	0,1838	13
18	0,1759	12
24	0,2418	9
27	0,1714	13
30	0,0916	+18
40	0,0	-

r_M = Tasa de incremento promedio obtenida después de haber seleccionado y homologado las diferentes curvas de crecimiento al modelo Monomolecular.
 - = no hubo crecimiento y + = más de 18 días

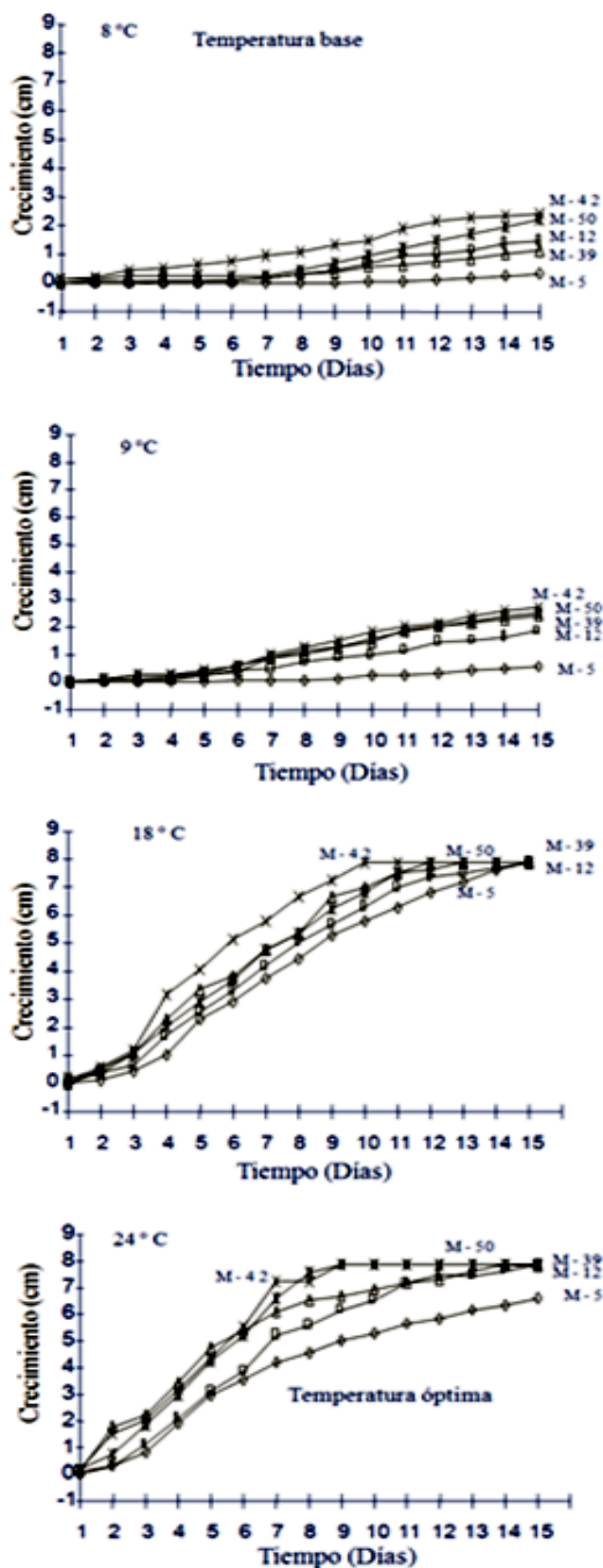


Figura 3. Crecimiento promedio de cinco cultivos monoconidiales de *Colletotrichum gloeosporioides* (M-5, M-12, M-39, M-42, M-50) sometidos *in vitro* a cuatro temperaturas.

En el presente estudio no hubo un sólo modelo que ajustará a todas las curvas de crecimiento, lo cual puede ser resultado en parte a la variabilidad genética del hongo.

Los resultados de estos análisis mostraron cuatro grupos: el primer grupo, correspondió a 24°C que fue la temperatura de óptimo desarrollo con una tasa de crecimiento alta ($r = 0,24$). El segundo grupo correspondió a las temperaturas 15, 16, 18 y 27°C con un crecimiento estadísticamente similar y con una tasa entre $r = 0,1838$ y $r = 0,1397$ pero subóptimo. El tercer grupo, con temperaturas de 9, 10, 13 y 30°C creció muy lentamente y su tasa fue entre 0,0916 y 0,0726. El cuarto grupo, con temperaturas de 4, 7, 8, y 40°C aunque estadísticamente iguales, a 8°C si hubo un desarrollo lento pero constante; mientras que en las otras tres temperaturas el hongo no se desarrolló (Cuadro 2), por lo que se determinó a 8°C como la temperatura base de *C. gloeosporioides*.

En campo se encontró que los frutos presentaron el mayor número de lesiones cuando las temperaturas medias fluctuaron de 15,4 a 17,9°C (agosto - noviembre). Por otra parte, las mayores tasas de crecimiento *in vitro* se presentaron entre 15 y 27°C, siendo la óptima a 24°C (Cuadro 3). Bajo condiciones de campo es probable que, además de la temperatura, la humedad relativa y la fase de desarrollo del fruto influyan en el número de lesiones.

El análisis de regresión indicó que no existe una relación positiva entre el número de esporas y la

temperatura, debido a que el coeficiente de determinación fue de menos de 0,3 en todos los casos (temperatura máxima $r^2 = 0,10$; media $r^2 = 0,18$; mínima $r^2 = 0,26$), ni para lesiones (temperatura máxima $r^2 = 0,004$; media $r^2 = 0,00$; mínima $r^2 = 0,01$). Por lo tanto la temperatura poco influye de forma independiente en la liberación de esporas y en la presencia de las lesiones. No obstante en el análisis gráfico de las variables involucradas en el

Cuadro 2. Tasas de crecimiento *in vitro* a 13 temperaturas de cinco cultivos monosporicos de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados de frutos de aguacate.

Temperatura (°C)	Tasa de Crecimiento (Promedio)	Ámbito †
24	0,2419	a
16	0,1838	ab
18	0,1760	ab
27	0,1716	ab
15	0,1397	ab
30	0,0952	bc
9	0,0788	bc
10	0,0745	bc
13	0,0726	bc
8	0,0153	c
7	0,0006	c
4	0,0000	c
40	0,0000	c

† Diferentes letras indican una diferencia estadística significativa según Tukey ($p \leq 0,05$).

Cuadro 3. Número de esporas y de lesiones de antracnosis en frutos de aguacate cv. Hass detectadas durante 1997 en un huerto comercial ubicado en San Juan Nuevo, Michoacán, se indican las temperaturas medias mensuales, la precipitación pluvial, así como las tasas de crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* a diferentes temperaturas *in vitro*.

Mes	Condiciones Ambientales			Condiciones <i>in vitro</i>		
	Lluvia (mm)	Temperatura media (°C)	Número de lesión	Número de esporas	Temperatura (°C)	Tasa de crecimiento
Enero	48,2	11,9	0	162	4	0,0
Febrero	15	14	0	131	7	0,0006
Marzo	0,0	15,9	2	244	8	0,0153
Abril	5,8	16	11	211	10	0,0745
Mayo	10,8	18,4	4	243	13	0,0746
Junio	489,3	18,9	6	392	15	0,1397
Julio	384,1	18,5	8	304	16	0,1838
Agosto	431,3	17,9	17	625	18	0,176
Septiembre	491,9	17,8	21	595	24	0,2419
Octubre	291,7	16	15	1413	27	0,1716
Noviembre	3,3	15,4	12	785	30	0,0952
Diciembre	0,0	12,7	0	576	40	0,0

patosistema, se observó también que la temperatura máxima y mínima no tienen relación con la severidad de la enfermedad y la liberación de esporas, pero sí se observó una influencia de la temperatura media, por esta razón, en el presente estudio solo se tomó en cuenta esta temperatura. Las poblaciones más altas de esporas de *C. gloeosporioides* se presentaron en los meses de junio-diciembre, mientras que las poblaciones más bajas fueron de enero - mayo esto coincidió con el mayor y menor número de lesiones en los frutos marcados para este fin, a excepción de diciembre, enero y febrero en donde debido a las bajas temperaturas no se registraron lesiones; se nota que en los meses de diciembre a mayo, el número de lesiones fueron bajas no obstante siempre hubo liberación de esporas. En los meses de junio y julio hubo pocas lesiones aun cuando la liberación de esporas y las lluvias fueron altas, esto probablemente se deba a que las primeras lluvias son absorbidas por el terreno seco y la vegetación debido a que se viene de un periodo seco y quizás, la humedad no sea suficiente para que se formen lesiones. De diciembre a febrero las temperaturas bajas aparentemente fueron el factor que limitó el desarrollo de las lesiones (Cuadro 3). En marzo y abril se registró una elevada liberación de esporas; sin embargo, solo en abril se incrementó el número de lesiones, esto debido probablemente a un riego pesado en el huerto debido a que en estos meses no se registró una precipitación importante.

La estación climática no registró la humedad relativa, que probablemente interactúa con la temperatura y explicaría mejor la relación de las lesiones en fruto con los factores ambientales. El desarrollo *in vitro* de *C. gloeosporioides* de 8 a 30 °C explica en parte el porque este hongo se encuentra presente en la mayoría de los huertos ubicados en las diferentes áreas de la zona aguacatera de Michoacán, e incluso en huertos donde la temperatura mínima llega a ser inferior de los 4 °C en las épocas frías del año, como sucede en algunos huertos del municipio de Tancítaro, y en aquellos donde se pueden alcanzar temperaturas máximas cercanas a los 30 °C como es el caso del municipio de Ziracuaretiro y parte de Uruapan y Tacámbaro (Morales, 1997). La capacidad que manifiesta este hongo para crecer y sobrevivir en una amplia variación de temperaturas explica en parte el que la enfermedad sea endémica en el estado de Michoacán. Como era de esperarse se encontró variación en la velocidad de crecimiento dentro de los cinco monoconidiales debido probablemente a que

fueron aislados de diferentes municipios de Michoacán.

CONCLUSIONES

La temperatura base de crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* fue de 8 °C. A 24°C los cultivos monoconidiales lograron su máximo crecimiento en el menor tiempo. En campo no hubo lesiones en frutos cuando la temperatura media fue inferior a los 14°C, lo mismo ocurrió cuando la temperatura rebasó los 18,9°C. También se pudo observar que a temperaturas medias mayores de 15°C el número de lesiones aumentó y entre 15,4 y 17,9°C se presentó el mayor número de lesiones.

LITERATURA CITADA

- Campbell L. C. and V. L. Madden. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons, New York. 532 p.
- Coakley, S. M.; L. R. McDaniel and G. Shaner. 1985. Model for predicting severity of *Septoria tritici* blotch on winter wheat. *Phytopathology* 75: 1245-1251.
- Dieckmann, M. 1992. Use of climatic parameters to predict the global distribution of *Ascochyta* blight on chickpea. *Plant Disease* 76: 409-412.
- Franc, G. D.; M. D. Harrison and L. K. Lahman. 1988. A simple day-degree model for initiating chemical control of potato early blight in Colorado. *Plant Disease* 72:851-854.
- Gadoury, D. M. and W. E. MacHardy. 1983. A 7-Day recording volumetric spore trap. *Phytopathology* 73: 1526-1531.
- Kranz, J. 1974. The role and scope of mathematical analysis and modeling in epidemiology. *In* Epidemics of Plant Diseases: Mathematical Analysis and Modeling (ed. J. Kranz). Springer New York. p. 7-54.
- Lázaro, B. V. 1985. Incidencia de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penz) en aguacate cv. Hass almacenado en refrigeración y su relación con el manejo cultural de las huertas en Uruapan, Michoacan. Tesis de Licenciatura

- UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 75 p.
- Madden, L. V. 1980. Quantification of disease progression. *Prot. Ecol.* 2: 159-176.
- Morales G., J. L. 1996. Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis del aguacate en Michoacán. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados, Montecillos, México 96 p.
- Morales G., J. L. 1997. Memorias del VI Curso de aprobación fitosanitaria en el manejo del aguacate. Facultad de Agrobiología "Pte Juárez"-SAGAR-CIAM-UMSNH. Uruapan, Michoacán. Septiembre. 290 p.
- Morales G., J. L. y A. F. J. Vidales. 1994. Enfermedades del aguacate en Michoacán. Folleto para productores Núm. 24. SARH-INIFAP-CIPAC- Uruapan, Michoacán, México. 19 p.
- Richards, F. J. 1959. A flexible growth function for empirical use. *J. Exp. Bot.* 10: 290-300.
- Téliz, O. D. 1999. El aguacate y su manejo integrado. Mundi prensa México, S.A. de C.V. 215 p.
- United States Department of Agriculture (USDA). 1997. Docket No. 94-116-5. Final rule: Hass avocados from Mexico. *Federal Register USA.* 102 p.
- Wilson, L. T. Y Barnett, W. 1983. Degree-Days: An aid in crop and pest management. *California Agriculture* 37: 4-7.