



First report of *Toumeyella parvicornis* (Cockerell) (Hemiptera: Coccidae) on *Pinus patula* Schltld. & Cham.

Primer reporte de la escama *Toumeyella parvicornis* (Cockerell) (Hemiptera: Coccidae) en *Pinus patula* Schltld. & Cham.

© Lizbeth Morales-Figueroa¹; © Pablo Martínez-Gil¹; © Víctor J. Arriola-Padilla²;

© Lizbeth G. Durán-Espinosa³; © David Cibrián-Tovar^{1*}; © Alejandro Corona-Ambriz¹

¹Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. Carretera México- Texcoco km 38.5. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Av. Progreso 5, Santa Catarina. C. P. 04010. Coyoacán, Ciudad de México, México.

³Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF). Carretera federal Pachuca-México km 37.5, Centro. C. P. 55740. Tecámac de Felipe Villanueva, Estado de México, México.

*Corresponding author: dcibrian48@gmail.com

Abstract

Introduction. *Toumeyella* are phytophagous pests that affect host plant growth, cause mortality, and consequently generate economic losses.

Objective. To identify *Toumeyella* responsible for infestations in nurseries of *Pinus patula* Schltld. & Cham. in the state of Puebla.

Materials and methods. Scale insects were collected from two-year-old *P. patula* plants, and microscopic slide preparations were made. The scales were identified taxonomically; for molecular identification, first-instar nymphs were used for DNA extraction, and the COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) gene was amplified by PCR. The resulting sequences were compared with available GenBank sequences of *Toumeyella* scales.

Results. Morphological characteristics, such as the absence of spiracular setae and the clustering of bilocular pores on the dorsum, were consistent with *T. parvicornis*. This study provides a new genetic sequence of the scale insect, which showed concordance with other *T. parvicornis* sequences deposited in GenBank. In addition, the presence of a parasitoid belonging to the family Encyrtidae was recorded in *T. parvicornis*.

Conclusion. This study represents the first report of *T. parvicornis* on *P. patula* and in central Mexico.

Keywords: Coccidae, Encyrtidae, soft scale, infestation, nursery.

Resumen

Introducción. Las escamas del género *Toumeyella* son fitófagos que afectan el crecimiento de la planta hospedante, ocasionan mortalidad y, por tanto, generan pérdidas económicas.

Objetivo. Identificar la escama *Toumeyella* que causa infestaciones en viveros de *Pinus patula* Schltld. & Cham. en el estado de Puebla.

Materiales y métodos. En plantas de *P. patula* de dos años se recolectaron escamas y se hicieron preparaciones microscópicas. Las escamas se identificaron taxonómicamente; para la identificación molecular se utilizaron ninfas del primer instar, se extrajo ADN y para la PCR se utilizó el gen COI (Citocromo Oxidasa Subunidad I). Las secuencias se compararon con secuencias disponibles de escamas *Toumeyella* del GenBank.

Resultados. Las características morfológicas, como la ausencia de setas espiraculares y la agrupación de poros biloculares en el dorso, coinciden con *T. parvicornis*. Esta investigación proporciona una nueva secuencia genética de la escama, la cual mostró coincidencia con otras secuencias registradas de *T. parvicornis* en GenBank. Por otra parte, se registró la presencia de un parasitoide de la familia Encyrtidae en *T. parvicornis*.

Conclusión. Este estudio es el primer reporte de la escama *T. parvicornis* en *P. patula* y en la región centro de México.

Palabras clave:

Coccidae, Encyrtidae, escama blanda, infestación, vivero.

Please cite this article as follows (APA 7): Morales-Figueroa, L., Martínez-Gil, P., Arriola-Padilla, V. J., Durán-Espinosa, L. G., Cibrián-Tovar, D., & Corona-Ambriz, A. (2026). First report of *Toumeyella parvicornis* (Cockerell) (Hemiptera: Coccidae) on *Pinus patula* Schltld. & Cham. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 32, e25027. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2025.07.027>



Introduction

Toumeyella parvicornis (Cockerell) is a soft scale insect belonging to the family Coccidae, recognized for its high fecundity, with females capable of laying up to 1014 eggs (Bragard et al., 2022). Originally, *T. parvicornis* was described in Florida on *Pinus taeda* L. and *P. australis* F. Michx. (= *P. palustris* Mill.) and since then it has been reported in Canada, the United States, and Mexico (García Morales et al., 2016), as well as in Caribbean regions (Malumphy et al., 2012). The broad geographic distribution of this scale insect, together with its ability to adapt to several species of *Pinus*, makes it a threat to nursery plant production.

At the international level, the spread of *T. parvicornis* has raised phytosanitary concerns (Dueñas-López, 2022). In the Turks and Caicos Islands (Caribbean region), *T. parvicornis* was identified in 2012 as a quarantine pest after causing severe decline in forests of *P. caribaea* var. *bahamensis* (Grisebach). In addition to the ecological damage, its presence resulted in high economic costs associated with sanitation measures, ranging from 5.1 million to up to 280 million USD (Malumphy et al., 2012). In Europe, the species has also become an important pest following its detection in Italy in 2014 and in France in 2021 (Bragard et al., 2022). In these countries, *T. parvicornis* has caused severe damage to *Pinus* forests, particularly to *P. pinea* L., negatively affecting physiological processes such as photosynthesis, tree health, and natural regeneration. Furthermore, it can lead to tree mortality, promote the growth of black sooty molds, and significantly alter forests ecosystems (Bragard et al., 2022).

Due to its potential impact *T. parvicornis* was classified in 2022 as a quarantine pest of the European Union, as it met all the criteria required for this category, including its high dispersal capacity and ecological impacts, despite its limited distribution across the continent (Bragard et al., 2022). One year later, an outbreak recorded in Italy caused mortality in at least 56 ha of *P. pinea*, with a potential risk of spreading to an additional 248 ha (Niccoli et al., 2024).

In Mexico, the presence of this pest was first reported in 2000 in the northeastern region of the country under the name *T. numismaticum* Pettit & McDaniel; however, it is currently considered a synonym of *T. parvicornis* (Myartseva & Ruíz-Cancino, 2000).

The morphology of *T. parvicornis* allows its identification at different developmental stages. The eggs are ovoid, pinkish, nearly transparent, and approximately 0.4 mm in length. First-instar nymphs, known as crawlers, are reddish, oval-shaped, and possess six short legs. Subsequent nymphal instars lack legs and are oval and

Introducción

Toumeyella parvicornis (Cockerell) es una escama blanda perteneciente a la familia Coccidae, reconocida por su alta fecundidad, capaz de poner hasta 1014 huevos por hembra (Bragard et al., 2022). Originalmente, *T. parvicornis* fue descrita en Florida, Estados Unidos, sobre *Pinus taeda* L. y *P. australis* F. Michx. (= *P. palustris* Mill.) y desde entonces se ha reportado en Canadá, Estados Unidos y México (García Morales et al., 2016), aunque también se encuentra en regiones del Caribe (Malumphy et al., 2012). La distribución geográfica amplia de la escama, y su capacidad de adaptación a varias especies de *Pinus*, la convierten en una amenaza para la producción de planta en viveros.

A nivel internacional, la expansión de la escama *T. parvicornis* ha generado preocupación fitosanitaria (Dueñas-López, 2022). En las Islas Turcas y Caicos (región Caribe), *T. parvicornis* fue identificada en 2012 como plaga cuarentenaria tras provocar una severa declinación en los bosques de *P. caribaea* var. *bahamensis* (Grisebach); además de los daños ecológicos, su presencia implicó costos económicos altos relacionados con medidas de saneamiento, que oscilaron entre 5.1 millones y hasta 280 millones de dólares (Malumphy et al., 2012). Por otro lado, en Europa, se ha convertido en una plaga relevante tras su detección en Italia en 2014 y en Francia en 2021 (Bragard et al., 2022). En estos países, *T. parvicornis* ha provocado daños severos en bosques de *Pinus*, especialmente en *P. pinea* L., afectando negativamente procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la salud del árbol y su regeneración natural; además, puede causar la muerte de los árboles, favorecer el crecimiento de fumaginas negras y alterar los ecosistemas significativamente (Bragard et al., 2022).

Debido a su impacto potencial, *T. parvicornis* fue clasificada en 2022 como plaga cuarentenaria de la Unión Europea, ya que cumplía con todos los criterios exigidos para dicha categoría, como su alta capacidad de dispersión y sus efectos ecológicos, a pesar de su distribución aún limitada en el continente (Bragard et al., 2022). Un año más tarde, un brote registrado en Italia provocó la mortalidad en al menos 56 ha de *P. pinea*, con un riesgo potencial de expansión hacia 248 ha adicionales (Niccoli et al., 2024).

En México, la presencia de esta plaga fue reportada por primera vez en el año 2000 en el noreste del país, bajo el nombre de *T. numismaticum* Pettit & McDaniel; actualmente, se considera sinónimo de *T. parvicornis* (Myartseva & Ruíz-Cancino, 2000).

La morfología de *T. parvicornis* permite su identificación en diferentes fases del desarrollo. Los huevos son ovoides, rosáceos, casi transparentes y miden aproximadamente

convex in shape. Adult females exhibit different forms depending on the substrate; they are oval when feeding on bark and elongated when found on needles, with a strongly convex reddish-brown body displaying dark stripes or mottling. As they mature, females develop a uniform brown coloration. Under severe infestations, females may overlap on twigs or needles, reaching up to 4.4 mm in length and 3.9 mm in width. In contrast, the male pupal cover is white, oval, translucent, and approximately 3.0 mm long. Although adult males are winged, they are rarely observed (Malumphy et al., 2012).

In this context, the objective of the present study was to identify the scale insect detected on two-year-old *Pinus patula* Schltld. & Cham. seedlings in a forest nursery in the state of Puebla, using a combined approach based on traditional taxonomy and molecular biology techniques.

Materials and Methods

Study area

The study area was the REFAURESTA nursery located in the municipality of Puebla, Puebla, Mexico, at 18° 58' 26.1" N, 98° 10' 33.0" W and 2225 m. The nursery has an annual production capacity of 12 000 to 17 000 trees aimed at supporting reforestation efforts in the state of Puebla. In this nursery, seedlings are produced using the traditional cultivation method, which consist of polyethylene bags filled with soil rich in organic matter as the main substrate (Aguilera-Rodríguez et al., 2023). At the time of collection, *P. patula* seedlings had not received fertilization or insecticide applications because the plants had remained in the nursery from previous years. The site has an approximate mean annual precipitation of 653.9 mm and a mean annual temperature of 16.3 °C (Comisión Nacional del Agua [CONAGUA], 2026).

Collection, slide mounting, and morphological identification

In August 2024, sixteen two-year-old *P. patula* seedlings infested with scale insects were collected from the REFAURESTA nursery in Puebla and transferred to the nursery of the Entomology Area of the División de Ciencias Forestales (DICIFO) at the Universidad Autónoma Chapingo. Subsequently, scale insects were collected in September 2024 and preserved in 96 % ethanol for species identification.

Permanent slide mounts of adult females in both elongated and rounded forms were prepared using the methodology described by Williams and Granara de Willink (1992), with some modifications. For clarification, an incision was made along one side

0.4 mm. Las ninfas del primer estadio, llamadas reptantes, son rojizas, ovaladas y poseen seis patas cortas. Las ninfas posteriores carecen de patas, son ovaladas y convexas. Las hembras adultas presentan varias formas según el sustrato; son ovaladas al alimentarse de la corteza y alargadas sobre las acículas, con un cuerpo fuertemente convexo, marrón rojizo con rayas oscuras o moteado. A medida que maduran, las hembras adquieren una coloración marrón uniforme. En infestaciones severas, las hembras pueden superponerse entre sí sobre ramillas o acículas, alcanzando hasta 4.4 mm de longitud y 3.9 mm de ancho. Por su parte, la cubierta pupal del macho es blanca, ovalada, translúcida y de unos 3.0 mm. Aunque los machos adultos son alados, rara vez se observan (Malumphy et al., 2012).

En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue identificar la escama detectada en ejemplares de *Pinus patula* Schltld. & Cham. de dos años en un vivero forestal del estado de Puebla, mediante el uso combinado de taxonomía tradicional y técnicas de biología molecular.

Materiales y métodos

Área de estudio

El área de estudio es el vivero REFAURESTA ubicado en el municipio de Puebla, Puebla, con coordenadas geográficas 18° 58' 26.1" N, 98° 10' 33.0" O y 2225 m. El vivero tiene una capacidad de producción anual de 12 000 a 17 000 árboles con la finalidad de contribuir a la reforestación en el estado de Puebla. En este vivero, el sistema de producción de planta es mediante el método tradicional, el cual consiste en bolsas de polietileno con suelo rico en materia orgánica como sustrato principal (Aguilera-Rodríguez et al., 2023). En la planta de *P. patula* no se aplicaba fertilización ni insecticidas al momento de la recolecta, debido a que se trataba de planta rezagada de años anteriores. La precipitación media anual aproximada del sitio es de 653.9 mm y la temperatura media anual es de 16.3 °C (Comisión Nacional del Agua [CONAGUA], 2026).

Recolección, montaje y determinación morfológica

En agosto de 2024 se recolectaron 16 plantas de *P. patula* de dos años infestadas de escamas, en el vivero REFAURESTA de Puebla y se trasladaron al vivero del Área de Entomología de la División de Ciencias Forestales (DICIFO) de la Universidad Autónoma Chapingo; posteriormente, se recolectaron escamas en septiembre de 2024 y se conservaron en etanol al 96 % para la determinación de la especie.

Se hicieron preparaciones fijas de hembras adultas en sus formas alargada y redonda; se utilizó la metodología de Williams y Granara de Willink (1992) con algunas modificaciones. Para el aclarado, se hizo una incisión

of the body of each specimen. The specimens were then immersed in a 10 % potassium hydroxide (KOH) solution. Elongated specimens were placed in a water bath for one hour until the tissue softened. In the case of parasitized females, the process was carried out without a water bath for up to 24 h and, in some cases, up to 72 h.

After clarification, the samples were rinsed with 70 % ethanol. Subsequently, the alcohol-acid technique was applied, which consisted of immersing the samples in a solution composed of 20 parts 80 % lactic acid, four parts glacial acetic acid, two parts phenol, and one part distilled water. The scale insects were maintained in this solution for 10 min and then transferred to a 5 % acid fuchsin stain for 5 min. Afterwards, the specimens were rinsed for 5 min in each of the following ethanol concentrations: 70 %, 80 %, 90 % and 96 %.

Finally, the samples were preserved in clove oil (*Syzygium aromaticum* [L.] Merr. & L. M. Perry) until slide mounting in Entellan®. This medium, composed of an acrylate polymer dissolved in xylene, allows the observation of the preparations under a light microscope. Morphological identification was carried out using the taxonomic keys of Howell and Williams (1976), Gill (1988) and Hamon and Williams (1984).

DNA extraction, PCR and sequencing

DNA was extracted using the 2 % cetyltrimethylammonium chloride (CTAB) method, modified from Doyle and Doyle (1987). A total of ten first-instar scale insects were used because nymphs from the second instar onward were parasitized, which could result in DNA contamination from the parasitoid. Collected specimens were placed individually into sterilized 1.5 mL tubes, and 250 µL of nuclease-free water was added. The specimens were then macerated using a sterilized micropestle. Subsequently, 200 µL of the homogenate was transferred to a clean, sterile 1.5 mL tube containing 600 µL of 2 % CTAB buffer (cetyltrimethylammonium bromide), 30 µL of 10 % SDS solution (sodium dodecyl sulfate), and 4 µL of proteinase K. The tubes were incubated in a dry bath (Corning® LSE™ Digital Dry Bath) at 65 °C for 30 min.

After incubation, the tubes were cooled at -20 °C for 2 min. Subsequently, 500 µL of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added, and the mixture was gently inverted for 5 min. The samples were then centrifuged at 10 000 rpm for 10 min, after which 600 µL of the supernatant was recovered and transferred to a new tube. An equal volume of isopropanol was added to the recovered supernatant, mixed by inversion, and incubated at -20 °C for 1 h. Finally, the mixture was centrifuged at 13 000 rpm for 15 min at room temperature to obtain a pellet.

en un costado del cuerpo de cada ejemplar. Luego, se sumergieron en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 %. Los ejemplares de forma alargada se colocaron en baño maría durante una hora, hasta que el tejido se ablandó. En el caso de las hembras parasitadas, el proceso se realizó sin baño maría durante un tiempo de hasta 24 h y, en algunos casos, hasta 72 h.

Después del aclarado, las muestras se enjuagaron con etanol al 70 %. A continuación, se aplicó la técnica alcohol-ácido que consiste en sumergir las muestras en una solución compuesta por 20 partes de ácido láctico al 80 %, cuatro partes de ácido acético glacial, dos partes de fenol y una parte de agua destilada. Las escamas se mantuvieron 10 min en esta solución, luego se transfirieron a una tinción con fucsina ácida al 5 % durante 5 min. Posteriormente, se enjuagaron durante 5 min en cada una de las siguientes concentraciones de etanol: 70 %, 80 %, 90 % y 96 %.

Finalmente, las muestras se conservaron en aceite de clavo (*Syzygium aromaticum* [L.] Merr. & L. M. Perry) hasta su montaje en medio rápido (Entellan®). Este medio, compuesto por un polímero de acrilatos solubilizado en xileno, permite la observación de las preparaciones bajo microscopio óptico. La morfología se describió con claves taxonómicas de Howell y Williams (1976), Gill (1988) y Hamon y Williams (1984).

Extracción de ADN, PCR y secuenciación

El ADN se extrajo con el método del cloruro de cetiltrimetilamonio al 2 % (modificado de Doyle & Doyle, 1987). Se utilizaron 10 escamas de primer instar, ya que, a partir del segundo instar, las ninfas estaban parasitadas y se obtendría ADN contaminado con el del parasitoides. Los ejemplares recolectados se colocaron en tubos esterilizados de 1.5 mL (uno por cada tubo), se agregaron 250 µL de agua libre de nucleasas y se maceraron con un micropistilo esterilizado. Se tomaron 200 µL del macerado y se colocó en un tubo limpio y estéril de 1.5 mL al cual se agregaron 600 µL de *buffer* CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) al 2 % + 30 µL de solución SDS (dodecilsulfato de sodio) al 10 % + 4 µL de proteínasa K. Los tubos se incubaron en un baño seco (Corning® LSE™ Digital Dry Bath) a 65 °C durante 30 min.

Transcurrida la incubación, los tubos se enfriaron a -20 °C durante 2 min. Después, se añadieron 500 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión durante 5 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min, se recuperaron 600 µL del sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo donde se agregó un volumen de isopropanol igual al volumen recuperado, se mezcló por inversión y se incubó durante 1 h a -20 °C. Por último, la mezcla se centrifugó a 13 000 rpm por 15 min a temperatura ambiente para formar una pastilla.

DNA amplification was performed using conventional Polymerase Chain Reaction (PCR). For this purpose, a 710 base pair (bp) fragment of the mitochondrial DNA gene encoding Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) was amplified using the primers LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994). The reaction mixture used for PCR is shown in Table 1.

The amplification conditions in the Multigene® thermocycler were as follows: one cycle of 2 min at 94 °C; 40 cycles consisting of three steps: 30 s at 94 °C, 30 s at 48 °C and 40 s at 72 °C; followed by one cycle of 7 min at 72 °C and a final hold at 4 °C. The amplification product was visualized by electrophoresis on a 1.5 % agarose gel stained with GelRed®.

The generated amplicons were sent to the Genomic Service Laboratory (Langebio-Cinvestav) for sequencing using the Sanger method. The resulting sequences were analyzed by comparison with the GenBank database (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2024a). A random alignment of the sequence of interest against the data base was performed using the BLASTn (NCBI, 2024b).

Parasitism percentage

Of the 16 collected plants, only six survived, on which a total of 547 scale insects were counted. The number of individuals presenting emergence holes was recorded to estimate the percentage of parasitism

La pastilla formada se lavó con 500 µL de etanol al 70 %, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se decantó y se dejó secar durante 2 h; finalmente, se suspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas.

La amplificación de ADN se hizo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional. Para ello, se amplificó un fragmento de 710 pares de bases (bp) del gen codificante a la enzima Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) del ADN mitocondrial con los oligonucleótidos LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994). La mezcla de reacción utilizada para la PCR se indica en el Cuadro 1.

Las condiciones de amplificación en el termociclador Multigene® fueron: 1 ciclo de 2 min a 94 °C; 40 ciclos de tres tiempos: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 48 °C y 40 segundos a 72 °C; 1 ciclo de 7 min a 72 °C y, finalmente, 4 °C. El producto de amplificación se visualizó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con GelRed®.

Los amplicones generados se enviaron al Laboratorio de Servicios Genómicos (Langebio-Cinvestav) para su secuenciación (método de Sanger). Las secuencias se analizaron mediante comparación con bases de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2024a). Se hizo un alineamiento al azar de la secuencia de interés con la base de datos mediante el servidor nBLAST (NCBI, 2024b).

Table 1. Reaction mixture used for DNA amplification of *Toumeyella* scale insects with the primers LCO1490/HCO2198.

Cuadro 1. Mezcla de reacción para la amplificación de ADN de escamas de *Toumeyella* con los oligonucleótidos LCO1490/HCO2198.

Reagent/ Reactivo	Initial concentration/ Concentración inicial	Final concentration/ Concentración final	Volume 1X (µL)/ Volumen 1X (µL)
PCR-grade nuclease-free water/ Agua libre de nucleasas PCR	-	-	17.05
PCR Buffer -Mg ⁺² / PCR Buffer -Mg ⁺²	10X	1X	2.50
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	200 µM	0.50
Forward primer (LCO1490)/ Iniciador directo (LCO1490)	10 µM	0.4 µM	1.00
Reverse primer (HCO2198)/ Iniciador reverso (HCO2198)	10 µM	0.4 µM	1.00
TaqPlatinum DNA polymerase/ TaqPlatinum DNA polimerasa	5 U·µL ⁻¹	0.4 U·µL ⁻¹	0.20
DNA/ ADN	100 ng·µL ⁻¹	8 ng·µL ⁻¹	2.00
Final volume/ Volumen final			25.00

using the following formula: % parasitism = (Number of parasitized scales / Total number of scales counted) x 100. Additionally, the parasitoid was identified to the family level.

Results

Morphological identification

According to the key for scale insect families (Homoptera: Coccoidea) of America and northern Mexico based on adult female characteristics proposed by Howell and Williams (1976), the specimens were assigned to the family Coccidae. One of the most important diagnostic characteristics was the anal opening covered by two triangular anal plates. Subsequently, the key of Gill (1988) for the genera of Coccidae in California was used to identify the insect as belonging to the genus *Toumeyella*. The main distinguishing characteristics were the reduced legs and antennae, as well as thoracic spiracles. For species identification, the key for soft scales of Florida by Hamon and Williams (1984) was used, and the specimens were identified as *T. parvicornis*. The characteristic that distinguishes this species from others is the absence of spiracular setae; that is, they are not differentiated from the marginal setae. In addition, the grouping of bilocular pores on the dorsal surface is distinctive of the species (Figure 1). These diagnostic characteristics were recognized in both forms of the female scale insect.

Molecular identification

The random alignment of the generated sequence and its comparison with the database using the BLASTn server (NCBI, 2024b) considered the percentage of coverage, identity, and the E-value. The latter indicates the number of alignments with scores equal to or greater than the raw score that are expected to occur randomly during a database search. An E-value close to 0 (on a scale from 0 to 1) suggests that the score and alignment are more significant and that there is homogeneity among the obtained alignments, allowing a reliable identification. Sequence analysis of the DNA sample indicated that the region flanked by primers LC01490/HC02198 (COI gene region) showed 100 % coverage and 97.33 % identity, as well as an E-value of 0.0 for *T. parvicornis* (GenBank accession number OR797509.1 with 675 bp linear DNA), supporting the identification of the Mexican specimens as *T. parvicornis*. Other sequences published in GenBank also corresponded to *T. parvicornis*, although with lower coverage and identity values, which is expected given the high intraspecific variability or different geographic origins (Table 2).

Porcentaje de parasitismo

De las 16 plantas recolectadas solamente sobrevivieron seis, en las cuales se hizo un conteo total de 547 escamas. Se determinó cuantas de ellas presentaron orificio de salida, para obtener el porcentaje de parasitismo con la fórmula siguiente: % de parasitismo = (Número de escamas parasitadas / Número total de escamas contadas) x 100. Adicionalmente, se hizo la identificación del parasitoide a nivel de familia.

Resultados

Determinación morfológica

De acuerdo con la clave para las familias de insectos escama (Homoptera: Coccoidea) de América y norte de México, basada en las características de la hembra adulta de Howell y Williams (1976), se llegó a la familia Coccidae; una de las características más importantes es la apertura anal cubierta con dos placas anales triangulares. Posteriormente, se utilizó la clave de Gill (1988) para los géneros de Coccidae de California, con la cual se determinó que el insecto corresponde al género *Toumeyella*, con patas y antenas reducidas y espiráculos torácicos como características distintivas. Para la especie, se utilizó la clave de las escamas blandas de Florida de Hamon y Williams (1984) y se determinó que se trata de *T. parvicornis*. La característica que la distingue de otras especies es la ausencia de setas espiraculares; es decir, que no se diferencian de las setas del margen. Además, la agrupación de poros biloculares en vista dorsal es distintiva de la especie (Figura 1). Estas características exclusivas de la especie se reconocieron en las dos formas de la escama hembra.

Determinación molecular

El alineamiento al azar de la secuencia generada y la comparación con la base de datos mediante el servidor nBLAST (NCBI, 2024b) consideró el porcentaje de cobertura, identidad y el valor estadístico E. Este último indica el número de alineamientos con puntajes iguales o mayores a la puntuación bruta, que se espera que surjan aleatoriamente en la búsqueda dentro de una base de datos. Un valor E cercano a 0 (con escala de 0 a 1) sugiere que la puntuación y la alineación son más relevantes, y que hay homogeneidad en los alineamientos obtenidos para determinar un resultado confiable. El análisis de la secuencia de la muestra de ADN indicó que la región flanqueada (región del gen COI) por los oligonucleótidos LC01490/HC02198 presentó 100 % de cobertura y 97.33 % de identidad, así como un valor de $E = 0.0$ para *T. parvicornis* (número de accesión: OR797509.1 con 675 bp linear ADN del GenBank), lo que permite aceptar que la especie mexicana corresponde a

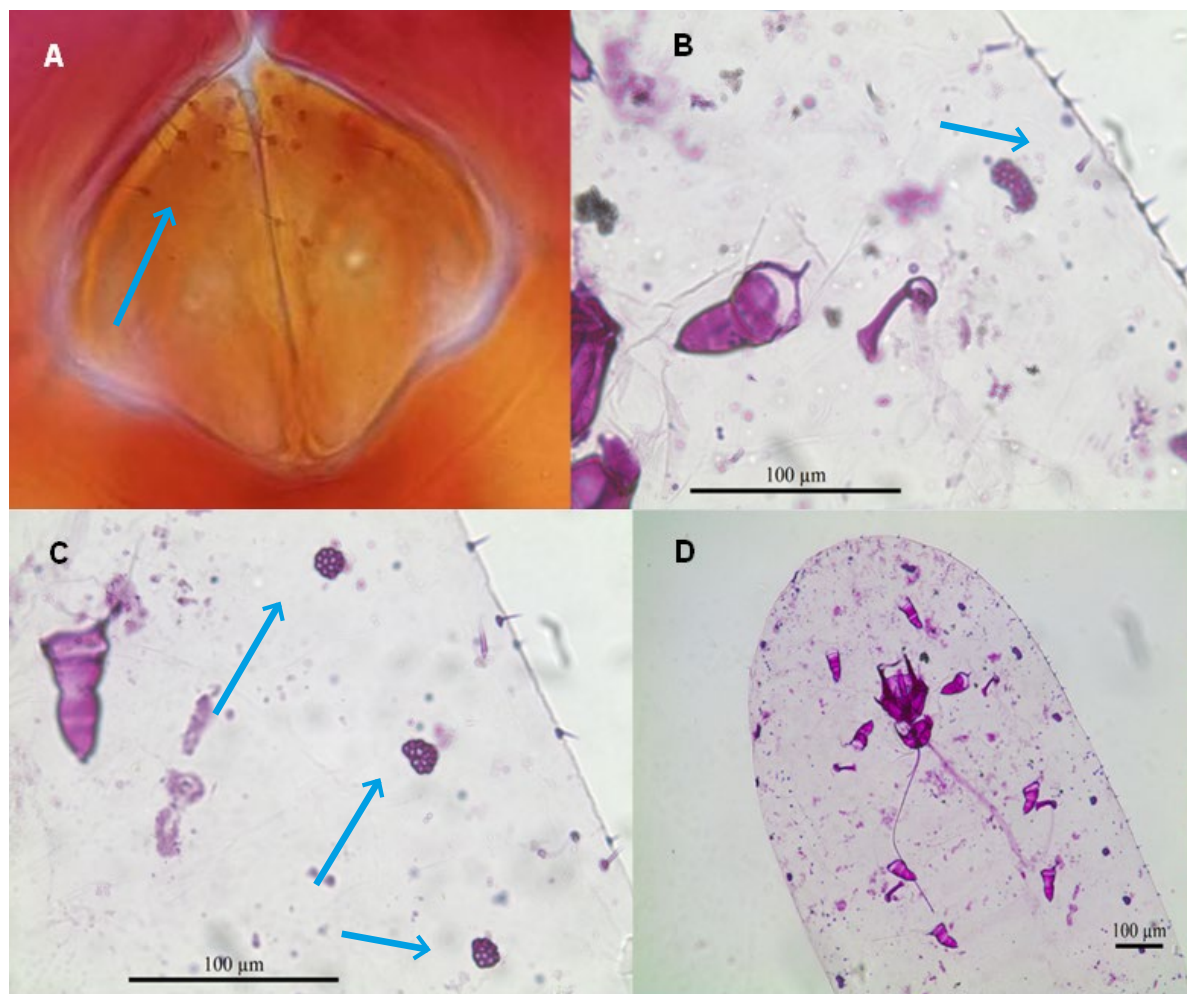


Figure 1. *Toumeyella parvicornis*. A) Triangular anal plates with nine apical setae on each plate. B) Ventral view of the margin showing the absence of spiracular setae. C) Grouping of bilocular pores in the submarginal area, dorsal view. D) Ventral view of the small, elongated form.

Figura 1. *Toumeyella parvicornis*. A) Placas anales triangulares con nueve setas apicales en cada una. B) Vista ventral del margen, ausencia de setas espiraculares. C) Agrupación de poros biloculares en submargen, vista dorsal. D) Vista ventral, forma pequeña y alargada.

Table 2. Sequence matches with *Toumeyella parvicornis* in the GenBank database.

Cuadro 2. Coincidencias de secuencias con *Toumeyella parvicornis* en la base de datos de GenBank.

Country/ País	Isolate* / Voucher specimen/ Aislado* / Comprobante	Accession number / Número de accesión	Coverage (%) / Cobertura (%)	Identity (%) / Identidad (%)	E-value / Valor E
Albania	TIR isolate / aislado TIR	OR797509.1	100	97.33	0.0
Italy / Italia	CF isolate / aislado CF	OQ996415.1	87	97.26	0.0
Canada / Canadá	Voucher specimen EAC084-10 / Comprobante EAC084-10	KR041198.1	96	90.31	0.0
Canada / Canadá	Voucher specimen EAC083-10 / Comprobante EAC083-10	HQ974643.1	96	90.31	0.0

* TIR and CF isolates are labels used only to distinguish samples or sequences.

* Aislados TIR y CF solo son etiquetas para distinguir muestras o secuencias.

Scale insect habits

The group of insects found in Puebla showed a different habit from that described by Hamon and Williams (1984), who reported that the small, elongated form of *T. parvicornis* is generally found on pine needles; however, in this case, both the elongated and rounded forms were feeding on the stem (Figure 2). All developmental stages were detected from September 2024 to January 2025, as well as the presence of a parasitoid belonging to the family Encyrtidae.

Parasitism percentage

A total of 547 scale insects were counted on six *P. patula* plants; 77 individuals (14.08 %) showed emergence holes from a parasitoid belonging to the family Encyrtidae (Figure 3; Table 3).

T. parvicornis. En otras secuencias publicadas en GenBank se muestran datos que corresponden a *T. parvicornis*, pero con menor cobertura e identidad, lo cual es esperable dada la gran variabilidad intraespecífica o el origen geográfico diferente (Cuadro 2).

Hábitos de la escama

Este grupo de insectos encontrados en Puebla demostraron un hábito diferente al mencionado por Hamon y Williams (1984), quienes indican que *T. parvicornis* presenta la forma pequeña y alargada que generalmente se hospeda en las acículas de pino, pero en este caso tanto la forma alargada como la redonda se encontraban alimentándose del tallo (Figura 2). Todos los estadios se detectaron durante septiembre de 2024 a enero de 2025, así como la presencia de un parasitoide que pertenece a la familia Encyrtidae.

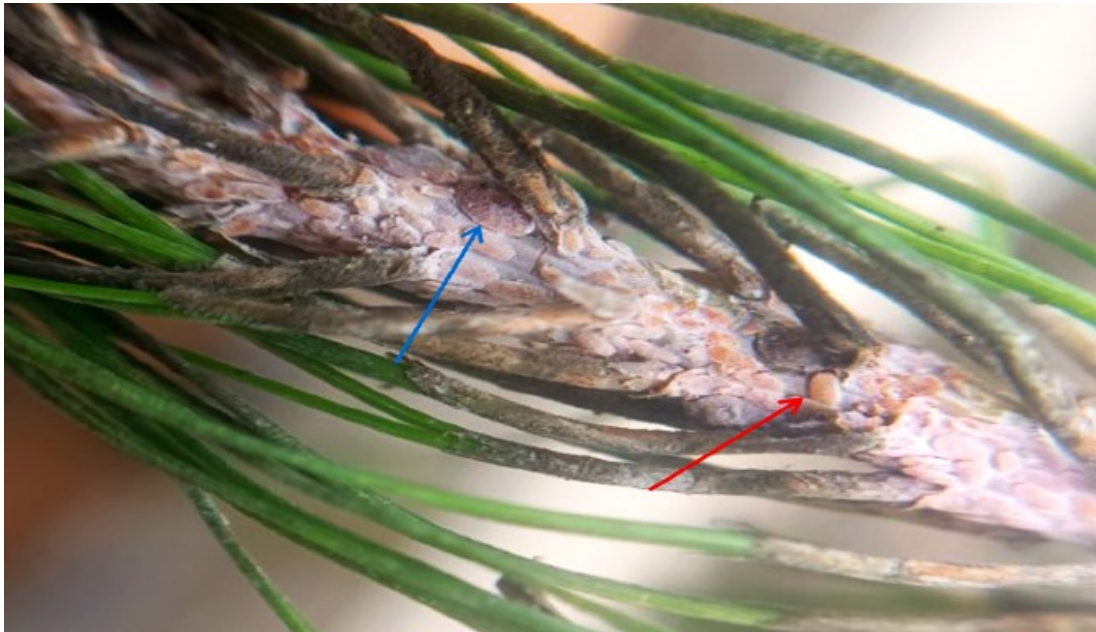


Figure 2. Elongated (red arrow) and rounded (blue arrow) females of the scale insect *Toumeyella parvicornis* on a branch of *Pinus patula*.

Figura 2. Hembras alargadas (flecha roja) y redondas (flecha azul) de la escama *Toumeyella parvicornis* en rama de *Pinus patula*.

Table 3. Total parasitism of *Toumeyella parvicornis* scale insects collected from *Pinus patula* plants.

Cuadro 3. Parasitismo total en escamas de *Toumeyella parvicornis* recolectadas en plantas de *Pinus patula*.

Plant / Planta	Number of scales / Número de escamas	Scale with emergence holes / Escamas con orificio de salida	Parasitized scales (%) / Escamas parasitadas (%)
1	105	5	4.76
2	97	7	7.22
3	121	21	17.36
4	41	11	26.83
5	56	6	10.71
6	127	27	21.26
Total	547	77	14.08



Figure 3. Females of *Toumeyella parvicornis* with emergence holes of a parasitoid belonging to the family Encyrtidae.
Figura 3. Hembras de *Toumeyella parvicornis* con orificio de salida del parasitoide de la familia Encyrtidae.

Discussion

The correct identification of pests affecting *P. patula* is essential for the implementation of appropriate management strategies. In this study, the species present was identified as *T. parvicornis*, a scale insect recognized for its negative impact on several pine species (Dueñas-López, 2022). This research provides valuable information regarding the presence of *T. parvicornis* in *P. patula* nurseries in central Mexico, a region where this pest had not previously been reported. Based on international evidence concerning the invasive behavior of this species and the damage it has caused in other regions of the world, the need to establish management measures in Mexico is further supported. Although its distribution in northern Mexico had been presumed due to the record of parasitoids reported by Myartseva and Cancino (2000), who identified the host as *T. numismaticum* (a synonym of *T. parvicornis*; Williams & Kosztarab, 1972), there had been no confirmed records in central Mexico or on *P. patula* as a host species.

The morphological identification of scale insects such as *T. parvicornis* represents a change due to the small size of the organism, the complexity of the procedures required to observe their diagnostic characteristics, and the limited specialized literature available. In

Porcentaje de parasitismo

El conteo total sumó 547 escamas en seis plantas de *P. patula*; 77 de ellas (14.08 %) tuvieron orificio de salida de un parasitoide de la familia Encyrtidae (Figura 3; Cuadro 3).

Discusión

La identificación correcta de las plagas que afectan a *P. patula* es fundamental para la implementación de estrategias adecuadas de manejo. En este caso, se determinó que la especie presente es *T. parvicornis*, una escama reconocida por su impacto negativo en diversas especies de pino (Dueñas-López, 2022). La presente investigación aporta información valiosa sobre la presencia de *T. parvicornis* en viveros de *P. patula* en el centro de México, una región donde esta plaga no había sido registrada. Con base en los antecedentes internacionales sobre el comportamiento invasivo y los daños que la plaga ha causado en otras regiones del mundo, se refuerza la posibilidad de establecer medidas de manejo en nuestro país. Si bien se asumía su distribución en el norte del país, debido al hallazgo de parasitoides por parte de Myartseva y Cancino (2000), quienes la registraron como *T. numismaticum* (sinónimo de *T. parvicornis*; Williams & Kosztarab, 1972), no existía una confirmación en la región centro ni en *P. patula* como hospedante.

this context, molecular tools have proven useful for complementing and confirming morphological identification. Nevertheless, these techniques also face limitations, mainly because of the scarce availability of genetic data in databases such as GenBank. For instance, prior to the study by Di Sora et al. (2023), only a single sequence of the COI gene was available, which was also used in the present study. The sequence obtained showed a match with accession number OR797509.1, corresponding to 675 bp of linear DNA available in that database.

An interesting aspect of the study by Di Sora et al. (2023) was the identification of *T. parvicornis* in mature *P. pinea* trees approximately 10 years old, with a diameter of 9 cm and a height of 3 m. In contrast, the present study focused on two-year-old *P. patula* seedlings, suggesting that the host age range of this scale insect is likely broad. Additionally, for the identification of adult females, the authors highlighted the presence of dorsal bilocular pores grouped on the dorsum and triangular anal plates as key diagnostic characteristic, which were also considered in the present study.

Regarding DNA extraction, Di Sora et al. (2023) used the body contents of adult females, composed mainly of eggs, in order to avoid external contamination. In contrast, the present study exclusively used first-instar scales. This decision was made because second-instar nymphs were parasitized, which could have interfered with the quality of the extracted DNA. Molecular identification was performed through the analysis of the 710 bp fragment amplified with the primers LC01490/HC02198, which showed similarity to *T. parvicornis* sequences recorded in GenBank.

Currently, four species of the genus *Toumeyella* are recognized as being associated with trees of the genus *Pinus*: *T. parvicornis*, *T. pini*, *T. pinicola* and *T. virginiana* (Garonna et al., 2015). However, *T. parvicornis* had not previously been reported on *P. patula*, and therefore this study represents the first worldwide record of this host-pest association. It is worth noting that, although *P. patula* is native to Mexico, it has been introduced and established in other countries for forestry purposes (Dlamini et al., 2025).

In European countries such as France and Italy, where *T. parvicornis* has caused significant impacts on forests ecosystems, advanced detection techniques such as remote sensing have been implemented to monitor its presence and spread (Falanga et al., 2024; Lasaponara et al., 2024). In Mexico, where its presence had not been clearly documented, the combination of morphological and molecular techniques is essential to confirm the identity of the scale insect. This finding supports the recognition of *T. parvicornis* as a potential forest pest, as it

La identificación morfológica de escamas como *T. parvicornis* representa un desafío, dado el tamaño reducido de los organismos, la complejidad de los procedimientos requeridos para observar sus características diagnósticas y la literatura especializada limitada. En este contexto, las herramientas moleculares han resultado de utilidad para complementar y confirmar la determinación morfológica. No obstante, estas técnicas también enfrentan limitaciones, principalmente por la disponibilidad escasa de datos genéticos en bases como GenBank. Por ejemplo, antes del estudio de Di Sora et al. (2023), solo se contaba con una secuencia disponible del gen COI, el cual fue empleado también en esta investigación. La secuencia obtenida mostró coincidencia con el número de acceso OR797509.1 de 675 pb de ADN lineal disponible en dicha base de datos.

Un aspecto interesante del estudio de Di Sora et al. (2023) fue la identificación de *T. parvicornis* en ejemplares adultos de *P. pinea* de aproximadamente 10 años, con 9 cm de diámetro y 3 m de altura. En contraste, esta investigación se enfocó en plantas jóvenes de *P. patula* de solo dos años, lo cual sugiere que el rango de edad de los hospederos de esta escama probablemente es amplio. Por otro lado, para la identificación de hembras adultas, los autores señalaron la presencia de poros biloculares dorsales agrupados en el dorso y placas anales triangulares como puntos clave, lo cual fue considerado también en este estudio.

En cuanto a la extracción de ADN, Di Sora et al. (2023) emplearon el contenido corporal de hembras adultas, compuesto principalmente por huevos, con el fin de evitar la contaminación externa. En cambio, en esta investigación se utilizaron exclusivamente escamas del primer instar. Esta elección se debió a que las ninfas del segundo instar se encontraban parasitadas, lo cual podría haber interferido con la calidad del ADN extraído. La determinación molecular se hizo mediante el análisis del fragmento flanqueado con los iniciadores LC01490/HC02198 de 710 pb que mostró coincidencia con secuencias registradas de *T. parvicornis* en GenBank.

Actualmente, se reconocen cuatro especies del género *Toumeyella* asociadas con árboles del género *Pinus*: *T. parvicornis*, *T. pini*, *T. pinicola* y *T. virginiana* (Garonna et al., 2015). No obstante, *T. parvicornis* no se había reportado anteriormente en *P. patula*, por lo que este estudio constituye el primer registro a nivel mundial en esta especie hospedera. Cabe destacar que, aunque *P. patula* es originaria de México, ha sido establecida en otros países con fines forestales (Dlamini et al., 2025).

En países europeos como Francia e Italia, donde *T. parvicornis* ha causado impactos importantes en ecosistemas forestales, se han implementado técnicas

is in other regions of the world, and highlights the need for further studies focused on its monitoring and control.

Regarding associated parasitoids, this study identified the presence of a parasitoid consistent with *Metaphycus flavus* (Encyrtidae), which has also been reported in Italy as a natural enemy of *T. parvicornis* with parasitism rates of 38 % (Garonna et al., 2018). In comparison, the present study recorded a parasitism level of 14.08 %, suggesting variability in the effectiveness of biological control, possibly influenced by environmental conditions or the developmental stage of the host.

Conclusions

This study provides a new genetic sequence of the *Toumeyella parvicornis* population found in *P. patula* stands, identified here as a new host in nursery systems. This finding will serve as a reference for the development of appropriate management strategies aimed at preventing the spread of this scale insect, which had not previously been reported on *P. patula*. Furthermore, additional research is needed to identify the parasitoid belonging to the family Encyrtidae and to understand its interaction with the scale insect, as well as its role in the biological control of the pest.

Acknowledgments

The authors thank the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, for the master's scholarship awarded to the first author.

Conflict of Interest Declaration

The authors declare that they have no economic conflicts of interest or known personal relationships that could have influenced the research presented in this article.

Declaration of Artificial Intelligence (AI) Use

The authors declare that no generative AI or AI-assisted technology was used in the preparation of this manuscript.

End of English version

References / Referencias

Aguilera-Rodríguez, M., Aldrete, A., Sánchez-Velázquez, J. R., & Prieto-Ruiz, J. A. (2023). Instalaciones e insumos para la producción. In A. Aldrete, J. R. Sánchez-Velázquez, M. Aguilera-Rodríguez, D. Cibrián-Tovar, & S. E. García-Díaz (Eds.), *Manual de buenas prácticas para el manejo de la salud de planta en viveros forestales* (pp. 41-90). Universidad Autónoma Chapingo.

avanzadas de detección como los sensores remotos, para el monitoreo de su presencia y dispersión (Falanga et al., 2024; Lasaponara et al., 2024). En el caso de México, donde su presencia no había sido documentada claramente, la combinación de técnicas morfológicas y moleculares es esencial para confirmar la identidad de la escama. Este hallazgo permite reconocer a *T. parvicornis* como una potencial plaga forestal, como lo es en otras regiones del mundo, lo que justifica la necesidad de hacer estudios adicionales orientados a su monitoreo y control.

En relación con los parasitoides asociados, en este estudio se identificó la presencia de un parasitoide que coincide con *Metaphycus flavus* (Encyrtidae), reportado también en Italia como enemigo natural de *T. parvicornis*, con tasas de parasitismo del 38 % (Garonna et al., 2018). En comparación, en esta investigación, se registró un nivel de parasitismo de 14.08 %, lo que sugiere variabilidad en la eficacia del control biológico, posiblemente influida por condiciones ambientales o por la fase de desarrollo del hospedante.

Conclusiones

Esta investigación proporciona una nueva secuencia genética de la población de *Toumeyella parvicornis* encontrada en poblaciones de *P. patula*, como nuevo hospedante, en viveros. Este hallazgo servirá como referencia para implementar un plan de manejo adecuado con el fin de evitar la dispersión de esta escama que no había sido reportada en *P. patula*. Por otra parte, será necesario realizar más investigación para identificar con precisión al parasitoide de la familia Encyrtidae y conocer su interacción con la escama, así como la función que cumple en el control biológico de la plaga.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, por la beca de maestría otorgada para el primer autor.

Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de intereses económicos ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en la investigación presentada en este artículo.

Declaración del uso de inteligencia artificial (IA)

Los autores declaramos no haber utilizado IA generativa o tecnología asistida por IA para el desarrollo del presente manuscrito.

Fin de la versión en español

- Bragard, C., Baptista, P., Chatzivassiliou, E., Di Serio, F., Gonthier, P., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortes, J. A., Parnell, S., Potting, R., Reignault, P. L., Stefani, E., Thulke, H. H., Van der Werf, W., Vicent Civera, A., Yuen, J., Zappalà, L., MacLeod, A. (2022). Pest categorization of *Toumeyella parvicornis*. *EFSA Journal*, 20(3), 24. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7146>
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2026, April 26). *Base de datos climatológica nacional: Estadística mensual de la estación 21101 Flor del Bosque, Amozoc, Puebla*. Coordinación General del Servicio Meteorológico Nacional. https://smn.conagua.gob.mx/tools/RECURSOS/Normales_Climatologicas/Mensuales/pue/mes21101.txt
- Di Sora, N., Turco, S., Brugnati, F., Rossini, L., Mazzaglia, A., Contarini, M., & Speranza, S. (2023). Molecular characterization and phylogenetic analysis of the pine tortoise scale insect *Toumeyella parvicornis* (Cockerell) (Hemiptera: Coccidae). *Forests*, 14, 1585. <https://doi.org/10.3390/f14081585>
- Dlamini, L. X., Lévêque, J., Thevenot, M., Feig, G. T., Mathieu, O., & Kotzé, E. (2025). Afforestation and wildfire-induced grassland degradation: Impact on soil carbon dynamics in temperate grasslands, Drakensberg, South Africa. *CATENA*, 252(March). <https://doi.org/10.1016/j.catena.2025.108886>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11–15. https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf
- Dueñas-López, M. A. (2022). *Toumeyella parvicornis* (Pine Tortoise Scale). *CABI Compendium*. CABI. <https://www.cabi.org/jisc/datasheet/54232>
- Falanga, V., Francini, S., Parisi, F., Cavalli, A., De Fioravante, P., Cucca, B., D'Amico, G., Chirici, G., Lasserre, B., Ottaviano, M., Munafò, M., & Marchetti, M. (2024). Near-real-time detection of insect outbreaks in urban trees using a planet scope time series. *Forests*, 15(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/f15122261>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299. https://www.mbari.org/wp-content/uploads/2016/01/Folmer_94MMBB.pdf
- García Morales, M., Denno, B. D., Miller, D. R., Miller, G. L., Ben-Dov, Y., Hardy, N. B. (2016). *ScaleNet: A literature-based model of scale insect biology and systematics* [Database]. *Toumeyella parvicornis* (Cockerell, 1897) (Coccidae: *Toumeyella*). <https://scalenet.info/catalogue/Toumeyella%20parvicornis/>
- Garonna, A. P., Foscari, A., Russo, E., Jesu, G., Somma, S., Cascone, P., & Guerrieri, E. (2018). The spread of the non-native pine tortoise scale *Toumeyella parvicornis* (Hemiptera: Coccidae) in Europe: a major threat to *Pinus pinea* in Southern Italy. *iForest*, 11, 628–634. <https://doi.org/10.3832/ifer2864-011>
- Garonna, A. P., Scarpato, S., Vicinanza, F., & Espinosa, B. (2015). First report of *Toumeyella parvicornis* (Cockerell) in Europe (Hemiptera: Coccidae). *Zootaxa*, 3949(1), 142–146. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3949.1.9>
- Gill, R. J. (1988). *The scale insects of California. Part 1 The soft scales (Homoptera: Coccoidea: Coccidae)*. Technical Series in Agricultural Biosystematics and Plant Pathology. <https://dokumen.pub/the-scale-insects-of-california-part-1-the-soft-scales-homoptera-coccoidea-coccidae-1.html>
- Hamon, A. B., & Williams, M. L. (1984). *The soft scale insects of Florida (Homoptera: Coccoidea: Coccidae)*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. <https://palmm.digital.flvc.org/islandora/object/uf%3A46687>
- Howell, J. O., & Williams, M. L. (1976). An annotated key to the families of scale insects (Homoptera: Coccoidea) of America, North of Mexico, based on characteristics of the adult female. *Annals of the Entomological Society of America*, 69, 181–189. <https://doi.org/10.1093/aesa/69.2.181>
- Lasaponara, R., Abate, N., & Masini, N. (2024). Early identification of vegetation pest diseases using sentinel 2 NDVI time series 2016–2023: The case of *Toumeyella parvicornis* at Castel Porziano (Italy). *IEEE Geoscience and Remote Sensing Letters*, 21, 1–5. <https://doi.org/10.1109/LGRS.2024.3386218>
- Malumphy, C., Hamilton, M. A., Manco, B. N., Green, P. W. C., Sánchez, M. D., Corcoran, M., & Salamanca, E. (2012). *Toumeyella parvicornis* (Hemiptera: Coccidae), causing severe decline of *Pinus caribaea* var. *bahamensis* in the Turks and Caicos Islands. *Florida Entomologist*, 95(1), 113–119. <https://doi.org/10.1653/024.095.0118>
- Myartseva, S. N., & Ruíz-Cancino, E. (2000). Annotated checklist of the Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) of México. *Folia Entomológica Mexicana*, 109, 7–33. https://www.researchgate.net/profile/Enrique-Ruiz-Cancino/publication/286335128_Annotated_checklist_of_the_Aphelinidae_Hymenoptera_Chalcidoidea_of_Mexico/links/618d676c61f098772081efdd/Annotated-checklist-of-the-Aphelinidae-Hymenoptera-Chalcidoidea-of-Mexico.pdf
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024a). *GenBank overview*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024a). *Basic local alignment search tool*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Niccoli, F., Kabala, J. P., Altieri, S., Faugno, S., & Battipaglia, G. (2024). Impact of *Toumeyella parvicornis* outbreak in *Pinus pinea* L. forest of Southern Italy: First detection using a dendrochronological, isotopic and remote sensing analysis. *Forest Ecology and Management*, 566, 122086. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2024.122086>
- Williams, D. J., & Granara de Willink, M. C. (1992). *Mealybugs of Central and South America*. CAB International.
- Williams, M. L., & Kosztarab, M. (1972). The insects of Virginia No 5. Morphology and systematics of the Coccidae of Virginia with notes on their biology (Homoptera: Coccoidea). https://www.vmnh.net/content/vmnh/uploads/PDFs/research_and_collections/the_insects_of_virginia/the_insects_of_virginia_no_5.pdf