

# Diversity and updated checklist of limno-terrestrial tardigrade species in Quintana Roo, Mexico

## Diversidad y actualización del listado de especies de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo, México

Wilbert A. Pérez-Pech<sup>1\*</sup>; Roberto Guidetti<sup>2</sup>; Abril Anguas-Escalante<sup>1</sup>;  
Juana I. Crisanto-Rodríguez<sup>3</sup>; Leopoldo Q. Cutz-Pool<sup>3</sup>

<sup>1</sup>El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Departamento de Sistemática y Ecología Acuática. Av. Centenario km 5.5. C. P. 0440. Chetumal, Quintana Roo, México.

<sup>2</sup>University of Modena and Reggio Emilia. Via Campi 213/D, 41125, Modena, Italia.

<sup>3</sup>Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Chetumal, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Av. Insurgentes núm. 330. C. P. 77013. Chetumal, Quintana Roo, México.

\*Corresponding author: wilbert.perez@posgrado.ecosur.mx; tel.: +52 983 168 0767.

### Abstract

**Introduction.** Quintana Roo is the only state in the Yucatán Peninsula where the limno-terrestrial tardigrade fauna has been documented; however, the records have been limited to generic reports.

**Objective.** To provide an updated checklist of limno-terrestrial tardigrades for Quintana Roo and to explore the spatiotemporal variation of these animals in two rural environments.

**Materials and methods.** A taxonomic review was conducted on tardigrades collected between 2016 and 2018. Moreover, during two sampling campaigns in 2018, specimens were collected from the moss *Aulacopilum* sp. and the lichen *Parmotrema* sp. in a citrus plantation and an evergreen forest fragment. Data were compared using the student's *t* test ( $P < 0.05$ ).

**Results and discussion.** *Kristenseniscus kofordi*, *Milnesium* sp. 1, *Milnesium* cf. *cassandrae*, *Macrobiotus alvaroi*, *Macrobiotus* cf. *polyopus*, *Macrobiotus* cf. *ocotensis*, *Macrobiotus* sp. 1, *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*, *Minibiotus* cf. *intermedius*, *Paramacrobiotus* cf. *savai*, *Mesobiotus* cf. *pseudopatiens* and *Ramazzottius* cf. *baumanni* were recorded. The addition of these taxa, along with previous records of *Echiniscus* sp. and *Doryphoribius chetumalensis*, increases the number of limno-terrestrial tardigrade species in Quintana Roo to 14, also the coastal mangrove forest is added to the list of environments in the entity. The highest species richness and Shannon-Wiener diversity were observed in the citrus plantation.

**Conclusions.** The updated checklist of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo comprises 14 species. Diversity was higher in the citrus plantation, suggesting that tardigrades adapt well to anthropogenic environments.

### Resumen

**Introducción.** Quintana Roo es el único estado de la península de Yucatán donde se ha documentado la fauna de tardígrados limnoterrestres; sin embargo, los listados se han limitado a reportes genéricos.

**Objetivo.** Proveer el listado actualizado de tardígrados limnoterrestres para Quintana Roo y explorar la variación espacio temporal de estos animales en dos ambientes rurales.

**Materiales y métodos.** Se hizo una revisión taxonómica de los tardígrados recolectados entre los años 2016 y 2018. Adicionalmente, durante dos campañas de muestreo en 2018, se recolectaron especímenes en musgo *Aulacopilum* sp. y líquen *Parmotrema* sp. de un cultivo de cítricos y un fragmento de selva mediana subperennifolia; los datos se compararon con una prueba *t* de Student ( $P < 0.05$ ).

**Resultados y discusión.** Se obtuvo el registro de *Kristenseniscus kofordi*, *Milnesium* sp. 1, *Milnesium* cf. *cassandrae*, *Macrobiotus alvaroi*, *Macrobiotus* cf. *polyopus*, *Macrobiotus* cf. *ocotensis*, *Macrobiotus* sp. 1, *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*, *Minibiotus* cf. *intermedius*, *Paramacrobiotus* cf. *savai*, *Mesobiotus* cf. *pseudopatiens* y *Ramazzottius* cf. *baumanni*. La suma de estos taxones y los registros previos de *Echiniscus* sp. y *Doryphoribius chetumalensis* elevan a 14 el número de especies en la lista de tardígrados limnoterrestres de Quintana Roo; asimismo, se adiciona el bosque de manglar costero a la lista de ambientes en la entidad. La mayor riqueza y diversidad de Shannon-Wiener se encontró en el cultivo de cítricos.

**Conclusiones.** El listado actualizado de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo está conformado por 14 especies. La diversidad fue mayor en el cultivo de cítricos, lo cual sugiere que los tardígrados se adaptan bien a los ambientes antrópicos.

**Keywords:** *Kristenseniscus kofordi*; *Macrobiotus alvaroi*; *Milnesium* sp.; *Rhizophora mangle*.

### Palabras clave:

*Kristenseniscus kofordi*; *Macrobiotus alvaroi*; *Milnesium* sp.; *Rhizophora mangle*.

## Introduction

Tardigrades inhabit marine, freshwater, and terrestrial ecosystems (Nelson et al., 2015). Research on this group has primarily focused on describing and listing limno-terrestrial species in natural environments (Bartels et al., 2016; Nelson et al., 2015). However, urban and rural environments can also host unique communities of limno-terrestrial tardigrades (González-Reyes et al., 2016; Guidetti et al., 2013; Meyer et al., 2013; Pérez-Pech et al., 2017).

In recent years, interest in studying tardigrade fauna in Mexico has increased (Dueñas-Cedillo et al., 2020; García-Román et al., 2022; Moreno-Talamantes et al., 2015, 2019; Moreno-Talamantes & León-Espinosa, 2019; Núñez et al., 2021). In the Yucatan Peninsula, only Quintana Roo has focused on the study of this fauna. Pérez-Pech et al. (2016, 2017) recorded tardigrades in urban environments in Chetumal and described *Doryphoribius chetumalensis* Pérez-Pech, Anguas-Escalante, Cutz-Pool & Guidetti, 2017. Moreover, Anguas-Escalante et al. (2018) and Cutz-Pool et al. (2019) studied tardigrade diversity in citrus plantations. At the national level, Quintana Roo is also a pioneer in the study of coastal marine tardigrades (Anguas-Escalante et al., 2020; Pérez-Pech et al., 2020).

The present study aimed to update the species checklist and records of tardigrades in Quintana Roo, and to compare the diversity of limno-terrestrial tardigrades between a citrus plantation and an evergreen forest fragment.

## Materials and Methods

Variation in tardigrade diversity between an extensive temporary citrus plantation and an adjacent evergreen forest fragment was evaluated in the ejido El Palmar, municipality of Othón Pompeyo Blanco (18° 26' 48" N, 88° 31' 50" W). Collections were made during two sampling campaigns, one in February (the 'nortes' season, a meteorological phenomenon characterized by intense, cold winds) and another in September (the rainy season) of 2018. In both the plantation and vegetation fragment, a 5 000 m<sup>2</sup> plot was established, where two transects were located in the internal and external region (Figure 1). On each transect, six trees were selected (spaced 10 m apart); from each tree, 10 cm<sup>2</sup> samples of the moss *Aulacopilum* sp. and the lichen *Parmotrema* sp. (the only genera present in the study area) were collected at a height of 1 m. At each site, the percentage of humidity and temperature were measured using a digital thermos hygrometer (Onset HOBO® data logger).

## Introducción

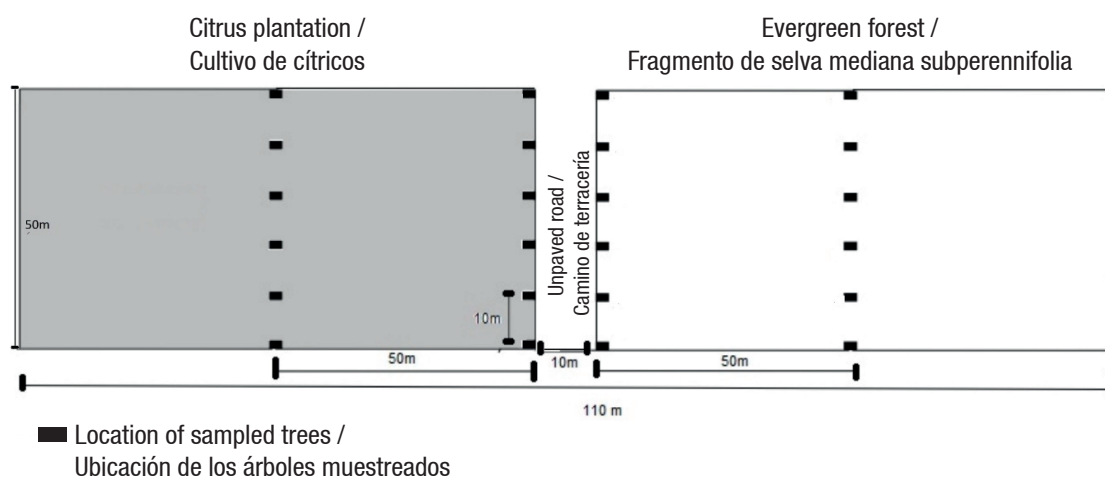
Los tardígrados habitan ecosistemas marinos, dulceacuícolas y terrestres (Nelson et al., 2015). Los estudios del grupo se han centrado principalmente en la descripción y listado de especies limnoterrestres en ambientes naturales (Bartels et al., 2016; Nelson et al., 2015); sin embargo, los ambientes urbanos y rurales pueden albergar una comunidad única de tardígrados limnoterrestres (González-Reyes et al., 2016; Guidetti et al., 2013; Meyer et al., 2013; Pérez-Pech et al., 2017).

En los últimos años, México ha incrementado el interés por el estudio de su fauna de tardígrados (Dueñas-Cedillo et al., 2020; García-Román et al., 2022; Moreno-Talamantes et al., 2015, 2019; Moreno-Talamantes & León-Espinosa, 2019; Núñez et al., 2021). En la península de Yucatán, solo Quintana Roo se ha centrado en el estudio de dicha fauna. Pérez-Pech et al. (2016, 2017) registraron tardígrados en ambientes urbanos de Chetumal y describieron a *Doryphoribius chetumalensis* Pérez-Pech, Anguas-Escalante, Cutz-Pool & Guidetti, 2017. Asimismo, Anguas-Escalante et al. (2018) y Cutz-Pool et al. (2019) estudiaron la diversidad de tardígrados en cultivos de cítricos. A nivel nacional, Quintana Roo también es pionero en el estudio de tardígrados marinos costeros (Anguas-Escalante et al., 2020; Pérez-Pech et al., 2020).

El presente estudio tuvo como objetivo actualizar el listado de especies y registros de tardígrados en Quintana Roo, así como comparar la diversidad de tardígrados limnoterrestres entre un cultivo de cítricos y un fragmento de selva mediana subperennifolia.

## Materiales y métodos

La variación en la diversidad de tardígrados entre un cultivo temporal extensivo de cítricos y un fragmento de selva mediana subperennifolia adyacente se evaluó en el ejido El Palmar, municipio de Othón Pompeyo Blanco (18° 26' 48" LN, 88° 31' 50" LO). La recolección se hizo durante dos campañas de muestreo, una en febrero (temporada de 'nortes', fenómeno meteorológico que se caracteriza por vientos intensos y fríos) y otra en septiembre (temporada de lluvias) de 2018. Tanto en el cultivo como en el fragmento de vegetación se estableció un cuadrante de 5 000 m<sup>2</sup>, donde a su vez se ubicaron dos transectos en su región interna y región externa (Figura 1). Sobre cada transecto se seleccionaron seis árboles (distanciados por 10 m); en cada árbol se recolectaron muestras de 10 cm<sup>2</sup> del musgo *Aulacopilum* sp. y del líquen *Parmotrema* sp. (únicos géneros presentes en el área de estudio) a 1 m de altura. En cada sitio se midió el porcentaje de humedad y temperatura con un termohigrómetro digital (Onset HOBO® data logger).



**Figure 1. Sampling design of limno-terrestrial tardigrades in trees of different vegetation in the ejido El Palmar, municipality of Othón Pompeyo Blanco, Quintana Roo.**

**Figura 1. Diseño de muestreo de tardígrados limno-terrestres en árboles de vegetación distinta en el ejido El Palmar, municipio de Othón Pompeyo Blanco, Quintana Roo.**

In the Zoology laboratory of the Tecnológico Nacional de México campus Chetumal, the samples were immersed in filtered tap water for 10 min and the pH was measured, following the methodology of Johansson et al. (2011); subsequently, the samples were sieved (mesh size 2 000  $\mu\text{m}$  and 38  $\mu\text{m}$ ). The obtained was reviewed with a stereomicroscope Nikon C-PS ZMZ445.

The tardigrades were preserved in 70 % alcohol and subsequently they were mounted in glass slides using Hoyer's liquid as medium mount. Taxonomic identifications were made with Axio Lab a1 (Zeiss) and DM RB (Leica) optical microscopes (up to 100x), using differential interference contrast (DIC) and phase contrast (PhC) using dichotomous keys (*Milnesium* [Morek et al., 2016], *Macrobiotus* [Kaczmarek & Michalczyk, 2017], *Mesobiotus* [Kaczmarek et al., 2020] *Minibiotus* [Claxton, 1998] and *Paramacrobiotus* [Kaczmarek et al., 2017]) and primary literature (Guidetti et al., 2019; Morek et al., 2016). The slides were deposited in the Tardigrade Collection associated with the Marine Nematode Collection of the Colegio de la Frontera Sur, in the Bertolani Collection of the Universidad de Modena y Reggio Emilia (Italy), and the Tardigrade Collection related to the Mite Collection of Mexico (CNAC) of the Instituto de Biología of the Universidad Nacional Autónoma de México.

To obtain the species checklist, samples available in the Zoology laboratory of the Tecnológico Nacional de México campus Chetumal, and the Tardigrade Collection associated with the Marine Nematode Collection of the College of the Colegio de la Frontera Sur were examined. These samples were compared with the taxa identified in the plantation and forest fragment and with specimens

En el laboratorio de Zoología del Tecnológico Nacional de México campus Chetumal, las muestras se sumergieron en agua filtrada del grifo durante 10 min y se midió el pH, siguiendo la metodología de Johansson et al. (2011); posteriormente, las muestras se tamizaron (luz de malla 2 000  $\mu\text{m}$  y 38  $\mu\text{m}$ ). Lo obtenido se revisó con ayuda de un estereomicroscopio Nikon C-PS ZMZ445.

Los tardígrados se preservaron en alcohol al 70 % y, posteriormente, se prepararon laminillas permanentes con líquido de Hoyer como medio de montaje. Las identificaciones taxonómicas se hicieron con microscopios ópticos Axio Lab a1 (Zeiss) y DM RB (Leica) (hasta 100x), utilizando contraste de interferencia diferencial (DIC) y el contraste de fase (PhC) con ayuda de claves dicotómicas (*Milnesium* [Morek et al., 2016], *Macrobiotus* [Kaczmarek & Michalczyk, 2017], *Mesobiotus* [Kaczmarek et al., 2020] *Minibiotus* [Claxton, 1998] y *Paramacrobiotus* [Kaczmarek et al., 2017]) y literatura primaria (Guidetti et al., 2019; Morek et al., 2016). Las laminillas se depositaron en la Colección de Tardígrados asociada a la Colección de Nemátodos Marinos del Colegio de la Frontera Sur, en la Colección Bertolani de la Universidad de Modena y Reggio Emilia (Italia), y en la Colección de Tardígrados asociada a la Colección Nacional de Ácaros (CNAC) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para obtener el listado de especies, se examinaron muestras disponibles en el laboratorio de Zoología del Tecnológico Nacional de México campus Chetumal y la Colección de Tardígrados asociada a la Colección de Nemátodos Marinos del Colegio de la Frontera Sur, las cuales se compararon con los taxones identificados en el área de cultivo y el fragmento de selva, y con especímenes de muestras de tallos de *Rhizophora mangle* L. de la Bahía

from samples of *Rhizophora mangle* L. stems from Chetumal Bay. To achieve this, 33 permanent slides from the work of Anguas-Escalante et al. (2018), conducted in an intensive citrus plantation in 2016 in El Palmar (18° 26' 48.0" N, 88° 31' 47.0" W), were reviewed. From the same locality, 20 samples (lichen and moss) collected by Cutz-Pool et al. (2019) in an extensive citrus plantation, and 48 samples (lichen and moss) collected by Pérez-Pech in 2018 in an evergreen forest fragment (unpublished data) were also reviewed. Finally, three lichen samples collected in February 2018 by Pérez-Pech (unpublished data) from coastal mangrove stems were examined ((18° 31' 14.1" N and 88° 16' 09.4" W)).

Abundance (N) and richness (S) of tardigrades were calculated. Diversity was assessed using species accumulation curves (Chao1 estimator) and the Shannon-Wiener index (H'). The difference in tardigrade diversity between the sampled environments and temporal variation was determined using Student's t-tests in Past 2.17c (Hammer et al., 2001). Environmental variables were correlated with tardigrade diversity through multidimensional scaling (MDS) analysis in Primer 6 (Clarke et al., 2006). For this, data on ecosystem type (citrus plantation and forest fragment), humidity, temperature, pH, and type of microecosystem (mosses and lichens) were evaluated.

## Results

### Species of the phylum tardigrada (Spallanzani, 1777)

#### *Kristenseniscus kofordi* (Schuster & Grigarick, 1966)

This species belongs to the genus *Kristenseniscus* Gąsiorek, Morek, Stec & Michalczyk, 2019 (Table 1). A total of 69 specimens collected from an extensive citrus plantation were analyzed. The specimens showed cuticular thickenings on the first and second pairs of plates and on the scapular and terminal plates. These features are characteristic of *K. kofordi* (Figure 2), a species that has been recorded in the state of Chiapas (Pilato, 2006), so there is a high probability that it belongs to the same species.

#### *Milnesium* Doyère, 1840

*Milnesium* sp. 1. A single individual was examined from an intensive citrus plantation. The specimen showed a [3-3]-[3-3/4] claw configuration and a smooth cuticle.

*Milnesium* cf. *cassandrae*. A total of 926 specimens were examined, collected from an extensive citrus plantation and an evergreen forest fragment; 10 specimens were collected from an intensive citrus plantation; and 17 specimens were found on lichen growing on the stems of *R. mangle* in the coastal area of Chetumal.

de Chetumal. Para ello, se revisaron 33 laminillas permanentes provenientes del trabajo de Anguas-Escalante et al. (2018) realizado en un cultivo intensivo de cítricos en 2016 en El Palmar (18° 26' 48.0" LN, 88° 31' 47.0" LO). De la misma localidad, se revisaron 20 muestras (liquen y musgo) colectadas por Cutz-Pool et al. (2019) en un cultivo extensivo de cítricos, y 48 muestras (liquen y musgo) colectadas por Pérez-Pech en 2018 en un fragmento de selva mediana subperennifolia (datos no publicados). Finalmente, tres muestras de liquen recolectados en febrero de 2018 por Pérez-Pech (datos no publicados) sobre tallos de mangle costero fueron revisadas ((18° 31' 14.1" LN, 88° 16' 09.4" LO).

Se calculó la abundancia (N) y riqueza (S) de tardígrados. La diversidad se evaluó mediante la curva de acumulación de especies (estimador Chao1) y el índice de Shannon-Wiener (H'). La diferencia de la diversidad de tardígrados entre los ambientes muestreados y la temporalidad se determinó con pruebas t de Student en Past 2.17c. (Hammer et al., 2001). Las variables ambientales se correlacionaron con la diversidad de tardígrados mediante el análisis de escalamiento multidimensional (MDS) en Primer 6 (Clarke et al., 2006). Para ello, se evaluaron los datos del tipo de ecosistema (cultivo de cítricos y parche de selva), humedad, temperatura, pH y tipo de microecosistema (musgos y líquenes).

## Resultados

### Especies del filo Tardigrada (Spallanzani, 1777)

#### *Kristenseniscus kofordi* (Schuster & Grigarick, 1966)

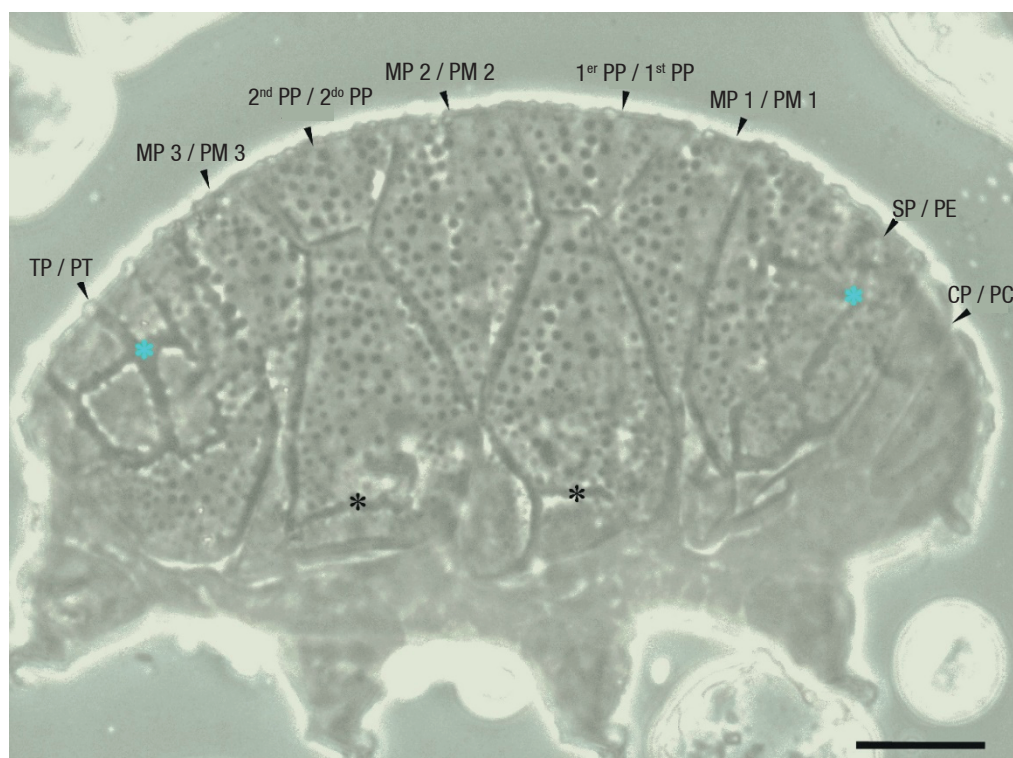
La especie pertenece al género *Kristenseniscus* Gąsiorek, Morek, Stec & Michalczyk, 2019 (Cuadro 1). Se examinaron 69 especímenes recolectados en un cultivo extensivo de cítricos. Los especímenes presentaron engrosamientos cuticulares en el primer y segundo par de placas y en las placas escapular y terminal. Estos son característicos de *K. kofordi* (Figura 2), especie que ha sido registrada en el estado de Chiapas (Pilato, 2006), por lo que existe probabilidad alta de que pertenezca a la misma especie.

#### *Milnesium* Doyère, 1840

*Milnesium* sp. 1. Se examinó solo un individuo proveniente de un cultivo intensivo de cítricos. El espécimen presentó la configuración de garras [3-3]-[3-3/4] y cutícula lisa.

*Milnesium* cf. *cassandrae*. Se examinaron 926 especímenes recolectados en un cultivo extensivo de cítricos y en un fragmento de selva mediana subperennifolia; 10 especímenes recolectados en un cultivo intensivo de cítricos; y 17 especímenes recolectados sobre liquen en tallos de *R. mangle* costero de la ciudad de Chetumal.





**Figure 2.** Dorsal region of *Kristenseniscus kofordi*. Blue asterisks indicate band-like thickenings that are interrupted, while the black asterisks indicate longitudinal band-like thickenings. Scapular plate (SP), cephalic plate (CP), median plate (MP), plate pair (PP), terminal plate (TP). Scale 20  $\mu\text{m}$ .

**Figura 2.** Región dorsal de *Kristenseniscus kofordi*. Los asteriscos azules señalan los engrosamientos en forma de bandas interceptadas y los asteriscos negros señalan los engrosamientos en forma de bandas longitudinales. Placa escapular (PE), placa cefálica (PC), placa media (PM), par de placas (PP), placa terminal (PT). Escala 20  $\mu\text{m}$ .

According to the identification key for the *granulatum* group, the specimens are closely related to *Milnesium cassandrae* Moreno-Talamantes, Roszkowska, García-Aranda, Flores-Maldonado & Kaczmarek, 2019, due to the presence of the [2-2]-[2-2] claw configuration. However, differences were observed in the pt index values (ratio of a character's length to the buccal tube length) at the insertion point of the support stylet, which exceeded 73  $\mu\text{m}$  (ranging from 75.18 to 93.14  $\mu\text{m}$ ), and in the buccal tube length, which was greater than 23  $\mu\text{m}$  (ranging from 30.54-49.09  $\mu\text{m}$ ).

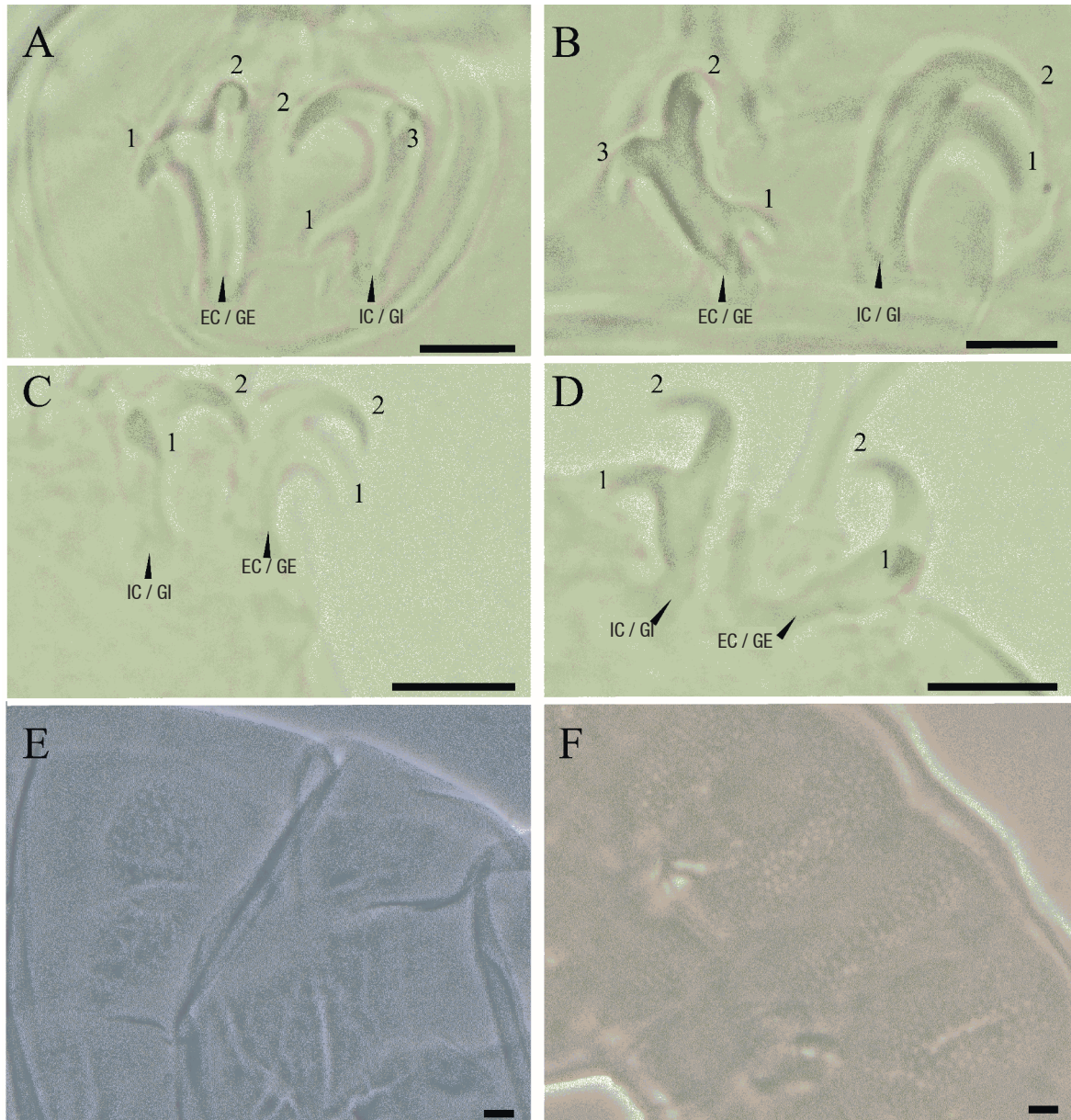
Based on the description provided for *M. cassandrae* (Moreno-Talamantes et al., 2019), the collected specimens match the [2-2]-[2-2] claw configuration in juveniles and the [2-3] [3-2] configuration in adults, as well as the reticular pattern of the dorsal cuticle (Figure 3).

Another species morphologically similar to this taxon, is *Milnesium katarzyna* Kaczmarek, Michalczyk & Beasley, 2004. However, *M. katarzyna* was described in China, while *M. cassandrae* is a native species from Mexico (Morek et al., 2022).

De acuerdo con la clave para el grupo *granulatum*, los especímenes son cercanos a *Milnesium cassandrae* Moreno-Talamantes, Roszkowska, García-Aranda, Flores-Maldonado & Kaczmarek, 2019, por la presencia de la configuración de garras [2-2]-[2-2]; sin embargo, se encontraron diferencias en el rango de valores del índice pt (proporción de la longitud de un carácter con la longitud del tubo bucal) del punto de inserción del estilete de soporte, el cual fue superior a 73  $\mu\text{m}$  (75.18-93.14  $\mu\text{m}$ ), y en la longitud del tubo bucal que fue superior a 23  $\mu\text{m}$  (30.54-49.09  $\mu\text{m}$ ).

Con base en la descripción provista para *M. cassandrae* (Moreno-Talamantes et al., 2019), los especímenes recolectados coinciden con la configuración de garras [2-2]-[2-2] en individuos juveniles y [2-3] [3-2] en adultos, así como con el arreglo reticular de la cutícula dorsal (Figura 3).

Otra especie cercana a los especímenes es *Milnesium katarzyna* Kaczmarek, Michalczyk & Beasley, 2004; sin embargo, esta es una especie descrita en China, mientras que *M. cassandrae* es una especie mexicana (Morek et al., 2022).



**Figure 3.** Diagnostic characters of the collected specimens of *Milnesium cf. cassandrae* A) Claw configuration [2-3] on leg III and B) claw configuration [3-2] on leg VI in adult specimens. C) Claw configuration [2-2] on leg II and D) Claw configuration [2-2] on leg VI in juvenile specimens. E) Reticular pattern of the dorsal cuticle in adult specimens and F) in juveniles. Internal claw (IC), external claw (EC). Scale = 20  $\mu$ m.

**Figura 3.** Caracteres diagn3sticos de los espec3menes recolectados de *Milnesium cf. cassandrae*. A) Configuraci3n de garras [2-3] de la pata III y B) configuraci3n de garras [3-2] de la pata VI en espec3menes adultos. C) Configuraci3n de garras [2-2] de la pata II y D) configuraci3n de garras [2-2] de la pata VI en espec3menes juveniles. E) Dise1o reticular de la cut3cula dorsal en espec3menes adultos y F) juveniles. Garra interna (GI), Garra externa (GE). Escala = 20  $\mu$ m.

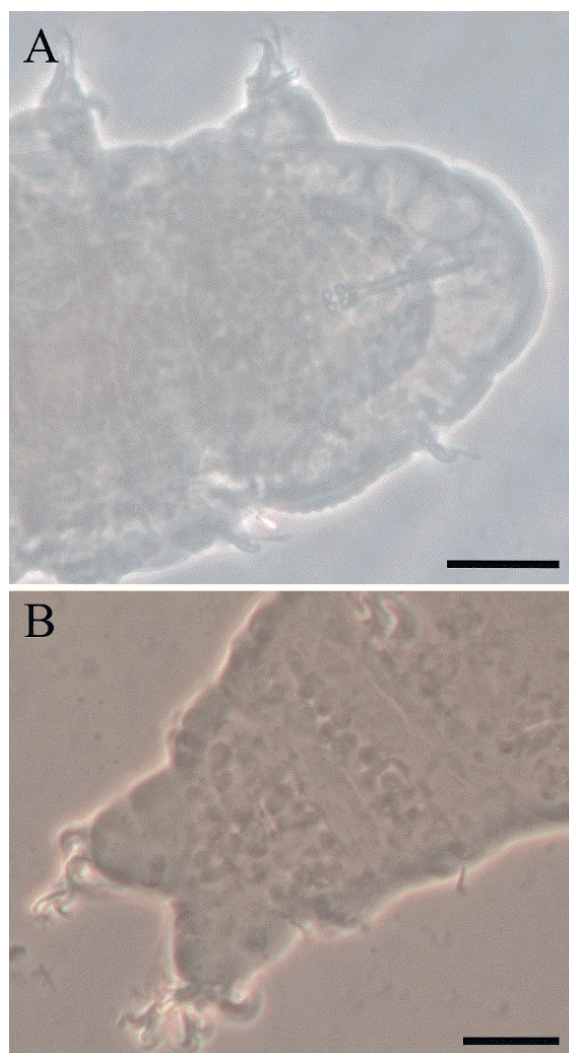
#### *Ramazzottius cf. baumanni*

This species belongs to the genus *Ramazzottius* Binda & Pilato, 1986. A total of 11 adult specimens and five eggs were examined, collected from an intensive citrus plantation. The animals exhibited a sculpted dorsal cuticle similar to that of *Ramazzottius baumanni* (Ramazzotti, 1962) (Figure 4A). However, the eggs of this species remain unknown. In this study, eggs were

#### *Ramazzottius cf. baumanni*

La especie corresponde al g3nero *Ramazzottius* Binda & Pilato, 1986. Se examinaron 11 ejemplares de adultos y cinco huevos recolectados en un cultivo intensivo de c3tricos. Los animales mostraron la cut3cula dorsal esculpida similar a *Ramazzottius baumanni* (Ramazzotti, 1962) (Figura 4A); sin embargo, en esta especie los huevos son desconocidos. En el presente estudio se





**Figure 4** A) Sculpted cuticle of specimens identified as *Ramazzottius* cf. *baumanni* B) Gibbosities of the dorsal cuticle of specimens identified as *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*. Scale = 20 µm.

**Figura 4.** A) Cutícula esculpida de los especímenes identificados como *Ramazzottius* cf. *baumanni*, B) gibbosidades de la cutícula dorsal de los especímenes identificados como *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*. Escala = 20 µm.

collected, but an extensive comparison with other species of the genus is necessary to determine whether it represents a new species.

#### *Macrobiotus* C. A. S. Schultze 1834

*Macrobiotus alvaroi* Pilato and Kaczmarek, 2007. A total of 194 adult specimens and 15 eggs were examined, collected from an extensive citrus plantation. This species belongs to the *polyopus* species complex (Marcus, 1928) of the genus *Macrobiotus*. The specimens collected share morphological similarities with *M. alvaroi* and *Macrobiotus ocotensis* Pilato, 2006.

The morphology of the processes in the collected eggs matched the descriptions of *M. alvaroi*, which features a hexagonal prism-shaped basal portion,

recolectaron huevos, pero se necesita una comparación exhaustiva con las otras especies del género para determinar si se trata de una especie nueva.

#### *Macrobiotus* C. A. S. Schultze 1834

*Macrobiotus alvaroi* Pilato and Kaczmarek, 2007. Se examinaron 194 especímenes adultos y 15 huevos recolectados en un cultivo extensivo de cítricos. La especie pertenece al complejo de especies *polyopus* Marcus, 1928, del género *Macrobiotus*; las más cercanas en morfología a los especímenes recolectados son *M. alvaroi* y *Macrobiotus ocotensis* Pilato, 2006.

La morfología de los procesos en los huevos recolectados correspondió a los descritos para *M. alvaroi*, el cual tiene una porción basal en forma de

a conical distal portion with an apex, and egg walls with a regular reticular design composed of hexagonal meshes (Pilato & Kaczmarek, 2007). Additionally, the buccal apparatus morphometry observed in both embryonated eggs and adult specimens corresponds to that of *M. alvaroi*, including the thickening at the end of the buccal tube, where the pharyngeal apophyses are connected (Figure 5).

The most significant differences between *M. alvaroi* and *M. ocotensis* are the shape of the egg processes and the buccal tube. The egg processes have a hexagonal prism-shaped basal portion, a conical distal portion with an apical tip, and a shell with a regular reticular design composed of hexagonal meshes (typical of *M. alvaroi*). The buccal tube shows thickening. These characteristics, typical of *M. alvaroi*, were observed in the examined specimens (Figure 6A).

*Macrobiotus cf. polyopus*. A total of 992 adult tardigrades and 43 eggs were examined, collected from an extensive citrus plantation and an evergreen forest fragment. The morphology of both the tardigrades and the examined eggs is characteristic of the *Macrobiotus polyopus* group (Figure 6B). However, the shape of the egg processes differs from all known species of the group, requiring a detailed review to determine whether it represents a new species.

prisma hexagonal, una porción distal cónica con un ápice y paredes del huevo con un diseño reticular regular con mallas hexagonales (Pilato & Kaczmarek, 2007). Además, la morfometría del aparato bucal observada en los huevos embrionados y en animales es similar a dicha especie, tal como el engrosamiento en el extremo del tubo bucal, al cual se conectan las apófisis faríngeas (Figura 5).

Las diferencias más importantes entre *M. alvaroi* y *M. ocotensis* son la forma de los procesos del huevo y el tubo bucal. Los procesos del huevo tienen una porción basal en forma de prisma hexagonal, una porción distal cónica con una apical y cascarón con un diseño reticular regular con mallas hexagonales (típico de *M. alvaroi*). El tubo bucal presenta engrosamiento. Dichos caracteres presentes en *M. alvaroi* se observaron en los ejemplares (Figura 6A).

*Macrobiotus cf. polyopus*. Se examinaron 992 tardígrados adultos y 43 huevos recolectados en un cultivo extensivo de cítricos y un fragmento de selva mediana subperennifolia. La morfología de los tardígrados y los huevos examinados son característicos de *Macrobiotus* grupo *polyopus* (Figura 6B). No obstante, la forma de los procesos de los huevos difiere de todas las especies del grupo; por tanto, es necesaria una revisión exhaustiva para determinar si se trata de una nueva especie.

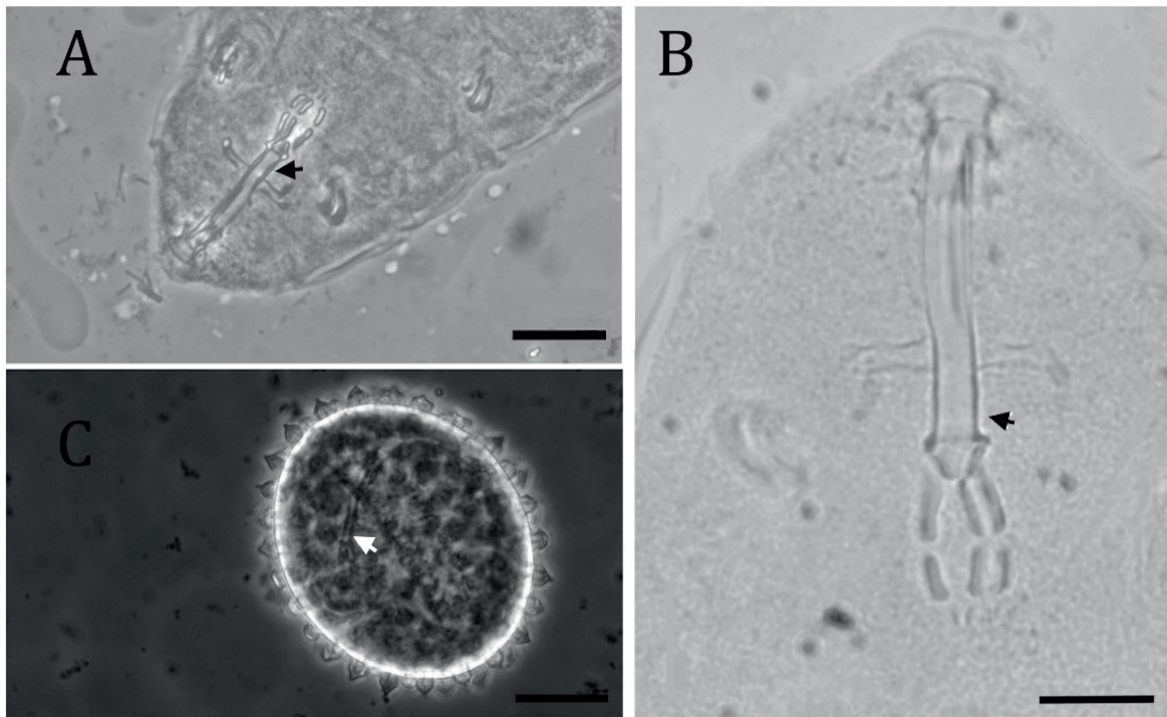


Figure 5. Buccal apparatus (A and B) and embryonated egg (C) of specimens identified as *Macrobiotus alvaroi*. Arrows indicate thickening at the end of the buccal tube. Scale = 20  $\mu$ m.

Figura 5. Aparato bucal (A y B) y huevo embrionado (C) de los especímenes identificados como *Macrobiotus alvaroi*. Las flechas señalan el engrosamiento en el extremo del tubo bucal. Escala 20  $\mu$ m.



*Macrobotus cf. ocotensis*. A single egg was examined, collected from an extensive citrus plantation. The egg diameter (excluding the processes) and the shape of the processes were similar to those documented for *M. ocotensis* (60 µm without processes and 80 µm with processes) (Figure 6C). However, the number of processes was lower than in *M. ocotensis*, with 20 processes along the circumference and 54 processes in a single hemisphere.

*Macrobotus sp. 1*. A total of 899 adult individuals and four eggs were examined, collected from an intensive citrus plantation. The specimens exhibited claws, a buccal apparatus, and eggs characteristic of the *hufelandi* group. The buccal tube was wider than that documented in the other species in this study. The eggs were not embryonated (Figure 6D), making it difficult to associate them with the adult specimens and, consequently, preventing their identification.

*Macrobotus cf. semmelweisi*. A total of 468 adults and nine eggs were examined, collected from an extensive citrus plantation. According to the identification key for the *Macrobotus hufelandi* group (Kaczmarek & Michalczyk, 2017), the examined tardigrades belong to the *Macrobotus* group with protuberances (Figure 4), which were similar to those documented for *M. semmelweisi*. However, the eggs differed in morphology from those described for this species (Figure 6F). Therefore, a thorough review is necessary to determine whether they represent a new species and to provide a formal description.

#### *Minibiotus cf. intermedius*

This species belongs to the genus *Minibiotus* R. O. Schuster, 1980 (Table 1). A total of 92 tardigrades and 10 eggs were examined, collected from an extensive citrus plantation. Although the observed set of characteristics in both the tardigrades and eggs corresponds to the description of *M. intermedius* (Plate, 1888) (Claxton, 1998; Figure 6E), it cannot be confirmed as this species. This uncertainty arises because Kaczmarek et al. (2016) classified records of *M. intermedius* in North America as doubtful.

#### *Mesobiotus cf. pseudopatiens*

This species belongs to the genus *Mesobiotus* Vecchi, Cesari, Bertolani, Jönsson, Rebecchi & Guidetti, 2016 (Table 1). A total of 485 individuals and 25 eggs were examined, collected from both extensive and intensive citrus plantations and an evergreen forest fragment.

Based on the identification key for *Mesobiotus* species by Kaczmarek et al. (2020), the specimens are close to *Mesobiotus wuzhishanensis* (Yin, L. Wang & X. Li, 2011) and

*Macrobotus cf. ocotensis*. Se examinó un huevo recolectado en un cultivo extensivo de cítricos. El diámetro del huevo (sin los procesos) y la forma de los procesos fueron similares a los documentados para *M. ocotensis* (60 µm sin procesos y 80 µm con procesos) (Figura 6C); sin embargo, el número de procesos, tanto en su circunferencia (20 procesos) como en un hemisferio (54 procesos), fue menor que en *M. ocotensis*.

*Macrobotus sp. 1*. Se examinaron 899 individuos adultos y cuatro huevos recolectados en un cultivo intensivo de cítricos. Los ejemplares presentaron garras, aparato bucal y huevos del grupo *hufelandi*. El tubo bucal fue más amplio que el documentado en las otras especies en este estudio. Los huevos no estaban embrionados (Figura 6D), por lo que fue difícil asociarlos con los animales y, por consiguiente, no permitieron la identificación.

*Macrobotus cf. semmelweisi*. Se examinaron 468 adultos y nueve huevos recolectados en un cultivo extensivo de cítricos. De acuerdo con la clave del grupo *Macrobotus hufelandi* (Kaczmarek & Michalczyk, 2017), los tardígrados examinados pertenecen al grupo *Macrobotus* con gibosidades (Figura 4), mismas que fueron similares a las documentadas para *M. semmelweisi*. No obstante, los huevos difieren de la morfología documentada en dicha especie (Figura 6F); por lo tanto, es necesaria una revisión exhaustiva para determinar si se trata de una nueva especie y así proporcionar su descripción formal.

#### *Minibiotus cf. intermedius*

La especie pertenece al género *Minibiotus* R. O. Schuster, 1980 (Cuadro 1). Se examinaron 92 tardígrados y 10 huevos recolectados en un cultivo extensivo de cítricos. A pesar de que el conjunto de caracteres observados en los tardígrados y huevos corresponden a la descripción de *M. intermedius* (Plate, 1888) (Claxton, 1998; Figura 6E), no se puede asegurar que corresponde a esta especie, debido a que Kaczmarek et al. (2016) catalogaron como dudosos los registros de esta especie en Norteamérica.

#### *Mesobiotus cf. pseudopatiens*

La especie corresponde al género *Mesobiotus* Vecchi, Cesari, Bertolani, Jönsson, Rebecchi & Guidetti, 2016 (Cuadro 1). Se examinaron 485 animales y 25 huevos recolectados en cultivos de cítricos (extensivo e intensivo) y en un fragmento de selva mediana subperennifolia.

Con base en la clave de especies de *Mesobiotus* de Kaczmarek et al. (2020), los especímenes resultan cercanos a *Mesobiotus wuzhishanensis* (Yin, L. Wang & X. Li, 2011) y *Mesobiotus pseudopatiens* Kaczmarek &

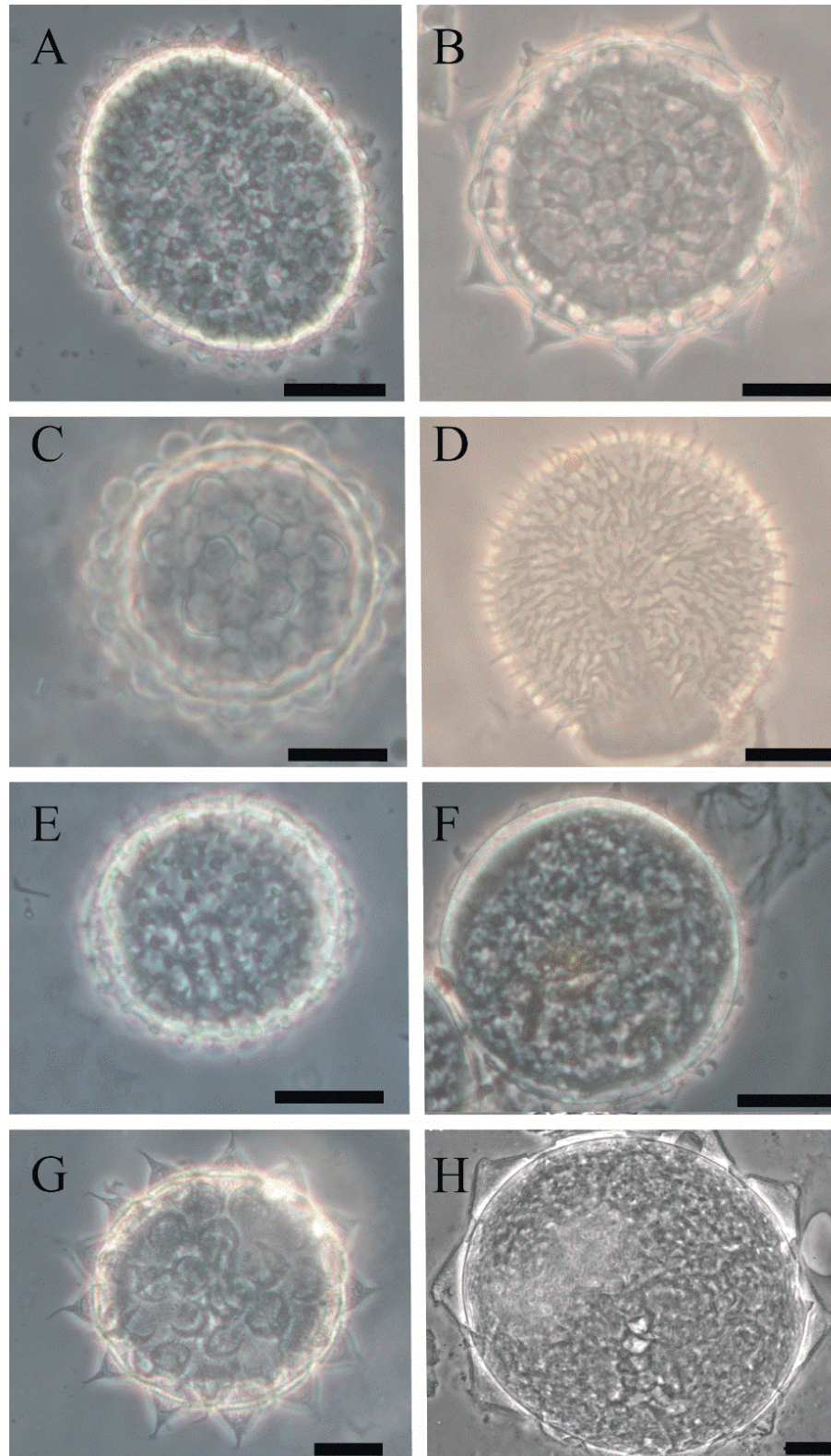


Figure 6. Eggs of the taxa identified during the study. A) *Macrobiotus savai*, B) *Macrobiotus cf. polyopus*, C) *Macrobiotus cf. ocotensis*, D) *Macrobiotus sp.* (*hufelandi* group), E) *Minibiotus cf. intermedius*, F) *Macrobiotus cf. semmelweisi*, G) *Mesobiotus cf. pseudopatiens*, H) *Paramacrobiotus cf. savai*. Scale 20  $\mu\text{m}$ .

Figura 6. Huevos de los taxones identificados durante el estudio. A) *Macrobiotus savai*, B) *Macrobiotus cf. polyopus*, C) *Macrobiotus cf. ocotensis*, D) *Macrobiotus sp.* (grupo *hufelandi*), E) *Minibiotus cf. intermedius*, F) *Macrobiotus cf. semmelweisi*, G) *Mesobiotus cf. pseudopatiens*, H) *Paramacrobiotus cf. savai*. Escala 20  $\mu\text{m}$ .



**Table 1. Updated list of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo and biotopes (moss *Aulacopilum* sp., Lichen *Parmotrema* sp., and Mangrove *Rhizophora mangle*).**

**Cuadro 1. Listado actualizado de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo y los biotopos donde se han colectado (musgo *Aulacopilum* sp., líquen *Parmotrema* sp. y mangle *Rhizophora mangle*).**

Taxa/ Taxones	Record/ Registro	Microecosystem/ Microecosistema	Source/ Fuente
Class/Clase: Heterotardigrada Marcus, 1927	<i>Echiniscus</i> sp.1	Soil in urban area/ Suelo en zona urbana	Pérez Pech et al. (2016, 2017)
Order/Orden: Echiniscoidea Richters, 1926 Family/Familia: Echiniscidae Thulin, 1928	<i>Kristenseniscus kofordi</i> (Schuster & Grigarick, 1966)	Lichen and moss/ Liquen y musgo	Cutz-Pool et al. (2019); this study/presente estudio
Class/Clase: Eutardigrada Richters, 1926 Order/Orden: Apochela Schuster, Nelson, Grigarick & Christenberry, 1980 Family/Familia: Milnesiidae Ramazzotti, 1962	<i>Milnesium</i> sp. 1  <i>Milnesium</i> cf. <i>cassandrae</i>	Lichen/ Liquen  Lichen, mossy and mangle/ Liquen, musgo y mangle	Anguas-Escalante et al. (2018)  Anguas-Escalante et al. (2018); Cutz-Pool et al. (2019); this study/presente estudio
Class/Clase: Eutardigrada Richters, 1926 Order/Orden: Apochela Schuster, Nelson, Grigarick & Christenberry, 1980 Family/Familia: Doryphoribiidae Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk, 2019	<i>Doryphoribius chetumalensis</i> Pérez-Pech, Anguas- Escalante, Cutz-Pool & Guidetti, 2017	Soil in urban area/ Suelo en zona urbana	Pérez Pech et al. (2016, 2017)
Class/Clase: Eutardigrada Richters, 1926 Order/Orden: Parachela Schuster, Nelson, Grigarick, Christenberry, 1980 Family/Familia: Ramazzottiidae Sands, McInnes, Marley, Goodall- Copestake, Convey & Linse, 2008	<i>Ramazzottius</i> cf. <i>baumanni</i>	Lichen/ Liquen	Anguas-Escalante et al. (2018)
Class/Clase: Eutardigrada Richters, 1926 Order/Orden: Apochela Schuster, Nelson, Grigarick & Christenberry, 1980 Family/Familia: Macrobiotidae Thulin, 1928	<i>Macrobiotus</i> cf. <i>semmelweisi</i>  <i>Macrobiotus</i> cf. <i>polyopus</i>  <i>Macrobiotus</i> sp. 1  <i>Macrobiotus alvaroi</i> Pilato & Kaczmarek 2007  <i>Macrobiotus</i> cf. <i>ocotensis</i>  <i>Mesobiotus</i> cf. <i>pseudopatiens</i>  <i>Minibiotus</i> cf. <i>intermedius</i>  <i>Paramacrobiotus</i> cf. <i>savai</i>	Moss and lichen/ Musgo y líquen  Moss and lichen/ Musgo y líquen  Moss and lichen/ Musgo y líquen  Moss and lichen/ Musgo y líquen  Lichen/Liquen  Moss and lichen/ Musgo y líquen	Cutz-Pool et al. (2019); this study/presente estudio  Cutz-Pool et al. (2019); this study/presente estudio  Cutz-Pool et al. (2019); this study/presente estudio  Cutz-Pool et al. (2019); this study/presente estudio  Cutz-Pool et al. (2019)  Anguas-Escalante et al. (2018), Cutz-Pool et al (2019), this study/presente estudio  Cutz-Pool et al. (2019); this study/presente estudio  Cutz-Pool et al. (2019); this study/presente estudio

*Mesobiotus pseudopatiens* Kaczmarek & Roszkowska, 2016. However, the former species is tooth-shaped in posterior lunules, while *M. pseudopatiens* has eyes and smooth lunules. Additionally, the egg morphology closely resembles *M. pseudopatiens*, a species described in Costa Rica (Figure 6G). For this reason, the specimens are more appropriately designated as *Mesobiotus* cf. *pseudopatiens*.

Roszkowska, 2016; sin embargo, el primero tiene dientes en las lúnulas posteriores y *M. pseudopatiens* tiene ojos y lúnulas lisas. Por otro lado, la morfología de los huevos se asemeja a *M. pseudopatiens* que fue descrita en Costa Rica (Figura 6G). Por esta razón, es más pertinente nombrar a la especie como *Mesobiotus* cf. *pseudopatiens*.



*Paramacrobotus cf. savai*

The genus is *Paramacrobotus* Guidetti, Schill, Bertolani, Dandekar & Wolf, 2009 (Table 1). A total of 66 individuals and four eggs were examined, collected from an evergreen forest fragment.

According to the taxonomic key for *Paramacrobotus* (Kaczmarek et al., 2017; Kayastha et al., 2023), the species closest to the collected specimens is *P. savai* (Binda & Pilato, 2001). However, these specimens differ in the smaller egg diameter without processes (90  $\mu\text{m}$  in *P. savai* and 76.4–77.2  $\mu\text{m}$  in the specimens) and the shape and size of the egg processes (12–18  $\mu\text{m}$  in height in *P. savai* and 5.8–13.41  $\mu\text{m}$  in the study specimens) (Figure 6H).

**Ecology**

A total of 4 725 tardigrades and 118 eggs, corresponding to nine species were collected from citrus plantations and an evergreen forest fragment (Tables 2 and 3). In the citrus plantation, moss and lichen were collected from the 12 selected trees during both sampling seasons. In the forest fragment, moss was collected from five trees (41 %) and lichen from four trees (33 %) in February 2018, while in September 2018, moss was collected from four trees (33 %) and lichen from six trees (50 %). For both sampled areas, the pH ranged from 5.09 to 6.80 in moss and from 4.04 to 7.36 in lichen (Table 2), the humidity ranged from 53 % to 94 %, and the temperature ranged from 26.50 °C to 36.0 °C.

Nine species were recorded in both environments (citrus plantation and forest fragment) during the study. When this number was compared with the Chao1 estimator (nine species), it was determined that the sampling effort was sufficient to document all the species present in both ecosystems (Figure 7). In terms of species richness and diversity, differences were observed between the sampled areas (Tables 2 and 3), with the citrus plantation showing the highest richness and Shannon-Wiener diversity in both sampling intervals.

When the Shannon-Wiener diversity was compared between moss and lichen, in February 2018, there was no significant difference ( $P > 0.05$ ). However, in September 2018, a significant difference was found ( $P = 0.03 < 0.05$ ) in the citrus plantation (Table 3). On the other hand, tardigrade diversity showed variation between the study months ( $P < 0.05$ ).

MDS estimated showed that diversity tended to increase toward the citrus crop during both sampling campaigns and was positively correlated with lower pH values (Figure 8A; Table 4). In September 2018, a better

*Paramacrobotus cf. savai*

El género es *Paramacrobotus* Guidetti, Schill, Bertolani, Dandekar & Wolf, 2009 (Cuadro 1). Se examinaron 66 individuos y cuatro huevos recolectados en un fragmento de selva mediana subperennifolia.

De acuerdo con la clave taxonómica de *Paramacrobotus* (Kaczmarek et al., 2017; Kayastha et al., 2023), la especie más cercana a los especímenes colectados es *P. savai* (Binda & Pilato, 2001). No obstante, estos se diferencian por el menor diámetro de huevo sin procesos (90  $\mu\text{m}$  en *P. savai* y 76.4–77.2  $\mu\text{m}$  en los especímenes) y la forma y tamaño de los procesos de los huevos (12–18  $\mu\text{m}$  de altura en *P. savai* y 5.8–13.41  $\mu\text{m}$  en los especímenes de estudio) (Figura 6H).

**Ecología**

Se recolectaron 4 725 tardígrados y 118 huevos que corresponden a nueve especies provenientes de cultivo de cítricos y de un fragmento de selva media subperennifolia (Cuadros 2 y 3). En el cultivo de cítricos, durante las dos temporadas de muestreos se recolectó musgo y líquen en los 12 árboles seleccionados. En el fragmento de selva, en febrero de 2018, se recolectó musgo en cinco árboles (41 %) y líquen en cuatro árboles (33 %), mientras que en septiembre de 2018 se recolectó musgo en cuatro árboles (33 %) y líquen en seis (50 %). Para ambas áreas muestreadas, el pH varió entre 5.09 a 6.80 en musgo y 4.04 y 7.36 en líquen (Cuadro 2), la humedad osciló entre 53 % al 94 % y la temperatura entre 26.50 °C a 36.0 °C.

Durante el estudio se registraron nueve especies en los dos ambientes (cultivo de cítricos y fragmento de selva). Al comparar dicho número con el obtenido mediante el estimador Chao1 (nueve especies), se determinó que el esfuerzo de muestreo fue el adecuado para documentar el total de especies presentes en ambos ecosistemas (Figura 7). En cuanto a la riqueza y diversidad, se observa variación entre las áreas muestreadas (Cuadros 2 y 3); la mayor riqueza y diversidad de Shannon-Wiener se encontró en el cultivo de cítricos, en ambas campañas de muestreo.

Cuando se comparó la diversidad de Shannon-Wiener entre musgos y líquenes, se observó que en febrero de 2018 fue similar ( $P > 0.05$ ), pero sí hubo diferencias significativas ( $P = 0.03 < 0.05$ ) en septiembre de 2018 (cultivo de cítricos, Cuadro 3). Por otro lado, la diversidad de tardígrados mostró variación entre los meses de estudio ( $P < 0.05$ ).

El MDS calculado mostró que la diversidad tendió a aumentar hacia el cultivo de cítricos durante las dos campañas de muestreo y esta se correlacionó positivamente con los valores más bajos del pH (Figura 8A;

**Cuadro 2. Parámetros de diversidad de tardígrados limnoterrestres recolectados en febrero de 2018 en un área de cultivo de cítricos y un fragmento de selva en Quintana Roo.**

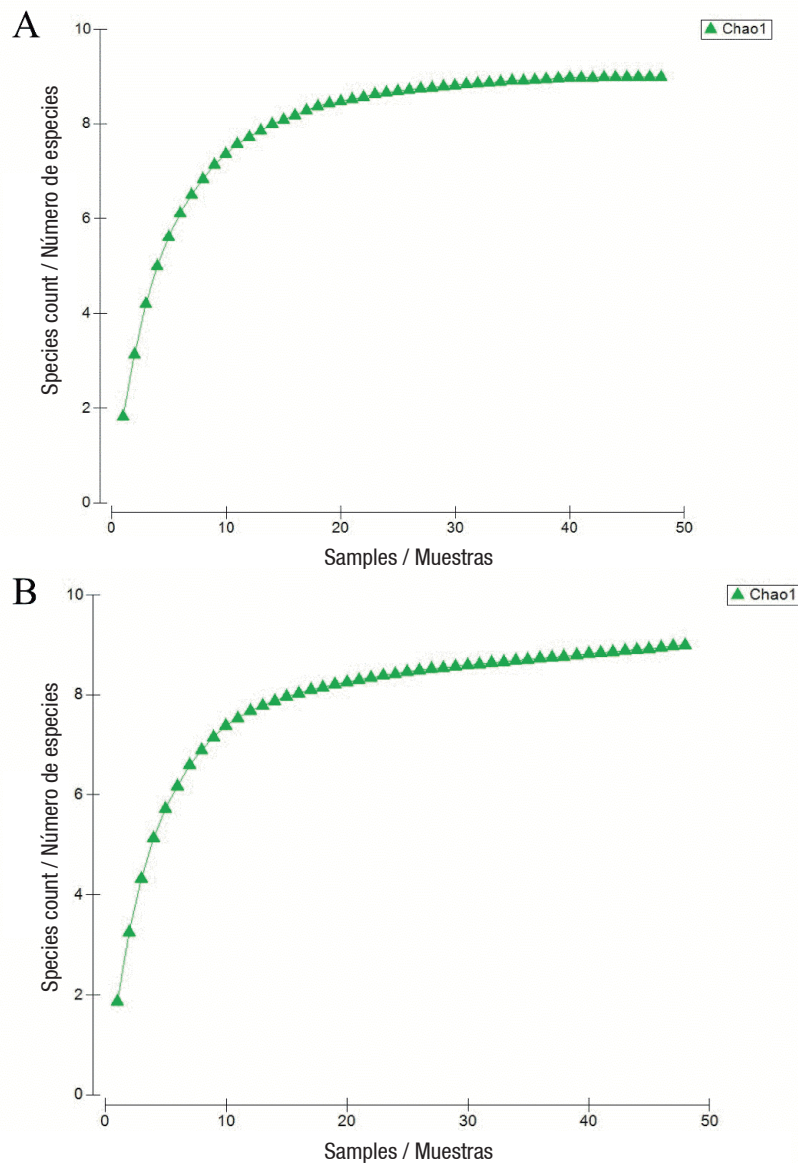
**Table 2. Diversity parameters of limno-terrestrial tardigrades collected in February 2018 in a citrus plantation and forest fragment in Quintana Roo.**

Species/Especies	Citrus plantation/ Cultivo de cítricos		Forest fragment/ Fragmento de selva	
	Moss/Musgo	Lichen/Liquen	Moss/Musgo	Lichen/Liquen
<i>Macrobiotus cf. semmelweisi</i>	32	109	0	0
<i>Macrobiotus grupo hufelandi</i>	317	59	0	0
<i>Macrobiotus cf. polyopus</i>	524	28	0	2
<i>Macrobiotus alvaroi</i>	102	30	0	0
<i>Paramacrobiotus cf. savai</i>	0	0	4	0
<i>Mesobiotus cf. pseudopatiens</i>	76	51	0	10
<i>Minibiotus intermedius</i>	82	4	0	0
<i>Milnesium cf. cassandrae</i>	341	142	1	23
<i>Kristenseniscus kofordi</i>	212	11	0	0
Abundance/Abundancia	1 686	434	5	41
Richness/Riqueza	8	8	2	3
Número de muestras	12	12	5	5
Diversidad de Shannon-Wiener (H')/ Shannon-Wiener diversity (H')	1.79	1.73	0.50	0.79
P value (t-test)/P valor (prueba t)	0.07	0.27		

**Table 3. Diversity parameters of limno-terrestrial tardigrades collected in September 2018 in a citrus plantation and forest fragment in Quintana Roo.**

**Cuadro 3. Parámetros de diversidad de tardígrados limnoterrestres recolectados en septiembre de 2018 en un área de cultivo de cítricos y un fragmento de selva en Quintana Roo.**

Species	Citrus plantation		Forest fragment	
	Moss	Lichen	Moss	Lichen
<i>Macrobiotus cf. semmelweisi</i>	63	264	0	0
<i>Macrobiotus grupo hufelandi</i>	264	259	0	0
<i>Macrobiotus cf. polyopus</i>	331	107	0	0
<i>Macrobiotus alvaroi</i>	36	28	0	0
<i>Paramacrobiotus cf. savai</i>	0	0	1	61
<i>Mesobiotus cf. pseudopatiens</i>	98	209	1	29
<i>Minibiotus intermedius</i>	0	6	0	0
<i>Milnesium cf. cassandrae</i>	290	161	2	3
<i>Kristenseniscus kofordi</i>	265	81	0	0
Richness/Riqueza	1 347	1 115	4	93
Número de muestras	12	12	4	6
Diversidad de Shannon-Wiener (H')/ Shannon-Wiener diversity (H')	7	8	3	3
P value (t-test)/P valor (prueba t)	1.74	1.81	1.04	0.75
P value (t-test)	0.03	0.88		



**Figure 7. Accumulation curve of limno-terrestrial tardigrades species in Quintana Roo from two sampling dates: A) February 2018 and B) September 2018.**

**Figura 7. Curva de acumulación de especies de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo en dos fechas de muestreo: A) febrero de 2018 y B) septiembre de 2018.**

stratification was observed regarding the similarity of diversity among the collection sites, which was related to the type of ecosystem (citrus plantation and forest fragment; Figure 8B).

### Discussion

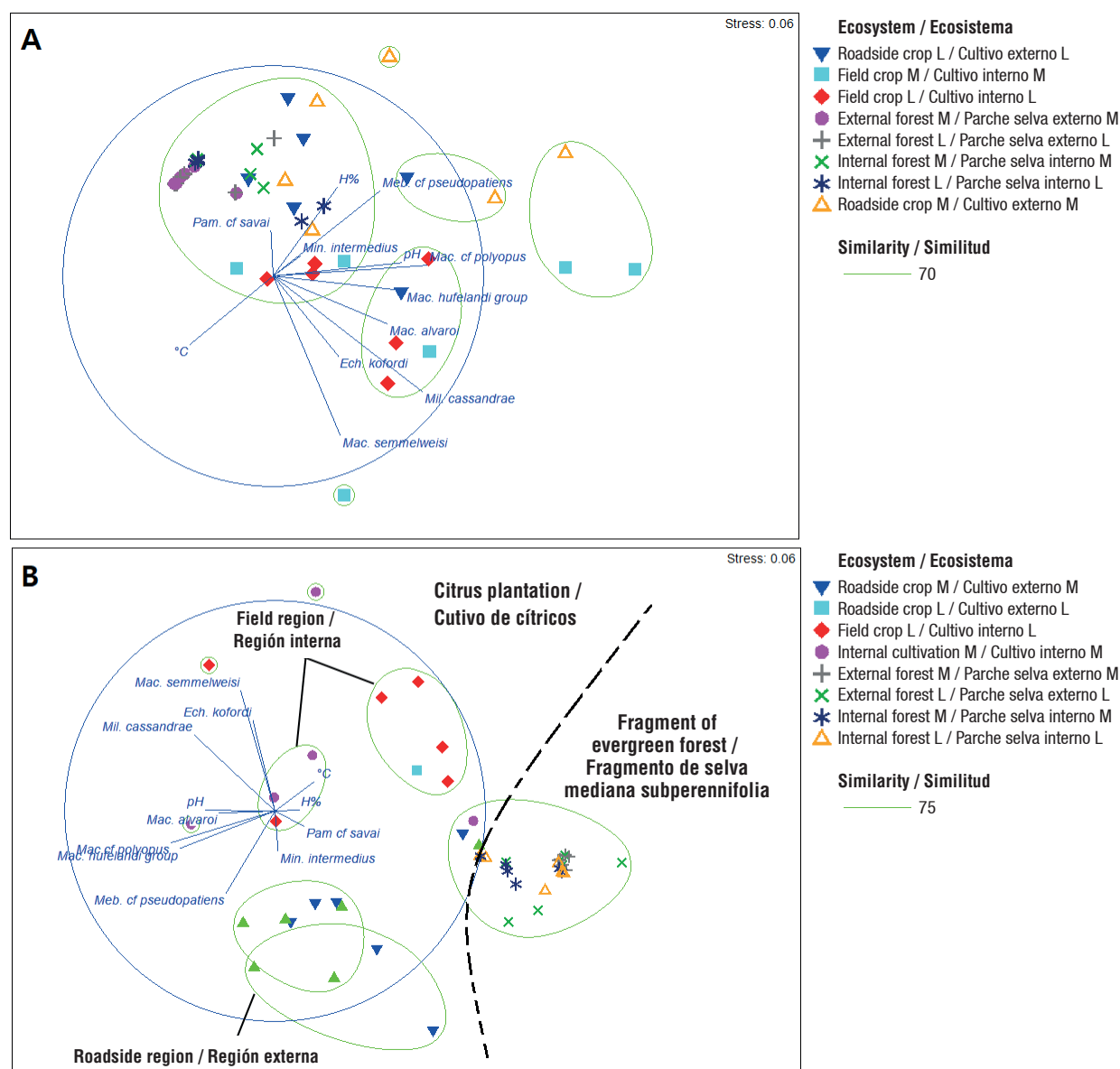
Currently, the cosmopolitan distribution of certain Tardigrada species is considered questionable (Gąsiorek, 2023; Kaczmarek et al., 2016; Morek et al., 2021); indeed, Mogle et al. (2018) proposed that, in the Americas, the distribution of limno-terrestrial tardigrades over large distances may be mediated by migratory birds. Gąsiorek (2023) established that the hypothesis “everything

Cuadro 4). En septiembre de 2018 se observó una mejor estratificación en cuanto a la similitud de la diversidad entre los sitios de colecta, la cual estuvo relacionada con el tipo de ecosistema (cultivo de cítricos y fragmento de selva; Figura 8B).

### Discusión

Actualmente, la distribución cosmopolita de determinadas especies de Tardigrada se considera dudosa (Gąsiorek, 2023; Kaczmarek et al., 2016; Morek et al., 2021); inclusive, cuando Mogle et al. (2018) propusieron que, en América, la distribución de tardígrados limnoterrestres a grandes distancias





**Figure 8.** Multidimensional scaling analysis of pH, temperature, humidity, richness, microhabitat, and sampled environments for the collection of limno-terrestrial tardigrades on two dates: A) February 2018, B) September 2018. M: moss, L: lichen. External cultivation refers to the crop area adjacent to the unpaved road, while internal cultivation refers to the area located at the center of the cultivation site.

**Figura 8.** Análisis de escalamiento multidimensional entre el pH, temperatura, humedad, riqueza, microhábitat y ambientes muestreados para la recolección de tardigrados limnoterrestres en dos fechas: A) febrero de 2018, B) septiembre de 2018. M: musgo y L: líquen. Cultivo externo se refiere a la zona del cultivo adyacente al camino de terracería y cultivo interno es la zona ubicada en el centro del área de cultivo.

is everywhere, but the environment selects” as a starting point for the biogeography of limno-terrestrial tardigrades has come to an end and has been replaced by a regional diversity approach.

Tardigrades are a poorly studied phylum worldwide. The number of species and the rate of their description is limited, which is reflected in the diversity estimates of the group, classifying it as species-poor (Bartels et

puede ser mediada por aves migratorias. Gąsiorek (2023) estableció que la hipótesis “todo está en todas partes, pero el medio ambiente selecciona”, como punto de partida para la biogeografía de tardigrados limnoterrestres, ha llegado a su fin y ha sido reemplazada por un enfoque regional de la diversidad.

Tardigrada es un filo poco estudiado a nivel mundial. El número de especies y la velocidad de su descripción

**Table 4. Parameters measured in the sampled areas (citrus plantation and evergreen forest fragment) for the collection of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo.**

**Cuadro 4. Parámetros medidos en las áreas muestreadas (cultivo de cítricos y fragmento de selva perennifolia) para la recolección de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo.**

Parameter/ Parámetro	Strata/Sustrato	February 2018/ Febrero 2018				September 2018/ Septiembre 2018			
		Minimum/ Mínimo	Maximum/ Máximo	Mean/ Media	SD	Minimum/ Mínimo	Maximum/ Máximo	Mean/ Media	SD
pH	Moss - citrus/ Musgo - cítricos	5.09	5.90	5.49	0.28	5.34	6.36	5.71	0.32
	Moss - forest/ Musgo - selva	5.80	6.38	6.04	0.24	6.03	6.80	6.39	0.33
	Lichen - citrus/ Liquen - cítricos	4.04	5.30	4.93	0.34	4.89	6.36	5.27	0.38
	Lichen - forest/ Liquen - selva	5.10	6.79	6.14	0.70	5.62	7.36	6.34	0.68
Humedy (%)	Moss - citrus/ Musgo - cítricos	53.00	94.00	71.33	14.24	57.00	76.00	69.83	5.47
	Moss - forest/ Musgo - selva	57.00	76.00	67.92	7.27	64.00	90.00	77.08	8.39
	Lichen - citrus/ Liquen - cítricos	53.00	94.00	71.33	14.24	57.00	76.00	69.83	5.47
	Lichen - forest/ Liquen - selva	57.00	76.00	67.73	7.27	64.00	90.00	77.08	8.39
°C	Moss - citrus/ Musgo - cítricos	26.50	32.00	29.68	2.11	28.50	34.90	31.58	2.14
	Moss - forest/ Musgo - selva	26.40	34.50	29.94	3.50	29.00	36.00	31.67	2.39
	Lichen - citrus/ Liquen - cítricos	26.50	32.00	29.68	2.11	28.50	34.90	31.58	2.14
	Lichen - forest/ Liquen - selva	26.40	34.50	29.88	3.50	29.00	36.00	31.67	2.39

SD: standard deviation of the mean

DE: desviación estándar de la media.

al., 2016). Today, the systematics of the group is based on a limited number of morphological traits for species delimitation, which is why many of these species are grouped into complexes, and their cryptic diversity is only revealed through molecular studies (Gąsiorek, 2023). In this study, 66 % of the identified taxa were found to be similar to other species (*Milnesium* cf. *cassandrae*, *Macrobiotus* cf. *polyopus*, *Macrobiotus* cf. *ocotensis*, *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*, *Minibiotus* cf. *intermedius*, *Paramacrobiotus* cf. *savai* and *Ramazzottius* cf. *baumanni*) and were considered morphospecies (*Milnesium* sp. 1 and *Macrobiotus* sp. 1). These taxa are likely new species for science. However, integrative taxonomy methods and molecular sequences are necessary to describe them (Gąsiorek, 2023).

son limitados, lo cual, se refleja en las estimaciones de diversidad del grupo que lo clasifican como pobre en especies (Bartels et al., 2016). Hoy en día, la sistemática del grupo está basada en un número reducido de rasgos morfológicos para la delimitación de especies, por lo que muchas de estas se agrupan en complejos y su diversidad críptica es encontrada solo a través de estudios moleculares (Gąsiorek, 2023). En este trabajo, 66 % de los taxones identificados se establecieron como similares a otras especies (*Milnesium* cf. *cassandrae*, *Macrobiotus* cf. *polyopus*, *Macrobiotus* cf. *ocotensis*, *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*, *Minibiotus* cf. *intermedius*, *Paramacrobiotus* cf. *savai* y *Ramazzottius* cf. *baumanni*) y como morfoespecies (*Milnesium* sp. 1 y *Macrobiotus* sp. 1). Es probable que estos taxones sean también nuevas especies para la

*M. ocotensis* was described for the state of Chiapas; however, it was not possible to confirm that our specimens belong to the same species due to the variations observed in the number of processes in the single egg collected (Pilato, 2006). In the case of *M. cassandrae*, its distribution in Quintana Roo could be assumed, as it is a Mexican species. It is distributed in northern Mexico, an area biogeographically located in the Nearctic, which has shown differentiated diversity from the Neotropics, the region where the study area of this work is located (Kaczmarek et al., 2016). Therefore, it would be premature to assert that this species is distributed in the study area. Although the genus *Milnesium* was long considered to consist of cosmopolitan species, the advent of molecular biology has cast doubt on this assumption (Gąsiorek, 2023). In 2021, Morek et al. determined that *Milnesium* has limited dispersal capabilities, and therefore its species are likely restricted to unique zoogeographical regions. In this regard, only the integration of molecular analysis into the morphological description of the collected specimens of *Macrobotus cf. ocotensis* and *Milnesium cf. cassandrae* could confirm the presence of these species in Quintana Roo or support the description of new species for science.

On the other hand, the species *K. kofordi* and *M. alvaroi*, previously recorded in Chiapas (Dueñas-Cedillo et al., 2020; García-Román et al., 2022), represent new records for Quintana Roo, contributing to the knowledge of the distribution of these species in Mexico. The addition of the taxa documented here, along with the previous records of *Echiniscus sp.* and *D. chetumalensis*, brings the total number of species on the list of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo to 14 (Pérez-Pech et al., 2016, 2017) (Table 1). Additionally, the coastal mangrove forest is added to the list of environments for these animals in the state. Previously, limno-terrestrial tardigrades had only been reported in citrus crops (Anguas-Escalante et al., 2018; Cutz-Pool et al., 2019) and accumulated sediment along the asphalt streets of the city of Chetumal (Pérez-Pech et al., 2016, 2017).

The 14 limno-terrestrial tardigrade taxa for Quintana Roo, along with the record of marine tardigrade species, bring the total to 28 species (Anguas-Escalante et al., 2020; Pérez-Pech et al., 2020). This study also provides images of the tardigrade eggs collected, which are important elements for species-level identification (Kaczmarek et al., 2017, 2020; Kaczmarek & Michalczyk, 2017; Morek et al., 2016). This information is crucial for use in future studies in the Yucatán Peninsula.

Regarding the ecology of urban and rural tardigrades, Meyer et al. (2013) suggest that environments created in the Anthropocene may support the maintenance

ciencia; sin embargo, para su descripción, es necesario implementar métodos de taxonomía integrativa y secuencias moleculares (Gąsiorek, 2023).

*M. ocotensis* es una especie descrita para el estado de Chiapas; sin embargo, las variaciones observadas en el número de procesos de único huevo recolectado no permiten asegurar que pertenezca a la misma (Pilato, 2006). En el caso de *M. cassandrae*, se podría suponer su probable distribución en Quintana Roo, debido a que es una especie mexicana. Esta se distribuye en el norte del México, zona que se localiza biogeográficamente en el Neártico, la cual ha mostrado diversidad diferenciada del Neotrópico, región donde se localiza el área de estudio del presente trabajo (Kaczmarek et al., 2016). Por lo tanto, sería aventurado asegurar que esta especie esté distribuida en el área de estudio. Aunque el género *Milnesium* se consideró por mucho tiempo integrado por especies cosmopolitas, el advenimiento de la biología molecular ha puesto en duda este supuesto (Gąsiorek, 2023). En 2021, Morek et al. determinaron que *Milnesium* tiene capacidades limitadas de dispersión y, por tanto, sus especies están probablemente restringidas a regiones zoogeográficas únicas. En este sentido, solo la integración de análisis moleculares a la descripción morfológica de los especímenes recolectados de *Macrobotus cf. ocotensis* y *Milnesium cf. cassandrae* podría confirmar la presencia de estas especies en Quintana Roo o en su caso dar soporte a la descripción de nuevas especies para la ciencia.

Por otra parte, las especies *K. kofordi* y *M. alvaroi*, registradas previamente en Chiapas (Dueñas-Cedillo et al., 2020; García-Román et al., 2022), representan nuevos registros para Quintana Roo, por lo que se contribuye al conocimiento de la distribución de estas especies en México. La suma de los taxones aquí documentados, junto con los registros previos de *Echiniscus sp.* y *D. chetumalensis*, elevan a 14 el número de especies en la lista de tardígrados limnoterrestres de Quintana Roo (Pérez-Pech et al. 2016, 2017) (Cuadro 1); asimismo, se adiciona el bosque de manglar costero a la lista de ambientes de dichos animales en el estado. Anteriormente, solo había reportes de tardígrados limnoterrestres en cultivos de cítricos (Anguas-Escalante et al., 2018; Cutz-Pool et al., 2019) y sedimento acumulado a orillas de las calles de asfalto de la ciudad de Chetumal (Pérez-Pech et al., 2016, 2017).

Los 14 taxones de tardígrados limnoterrestres para Quintana Roo, junto al registro de especies de tardígrados marinos, suman 28 especies (Anguas-Escalante et al., 2020; Pérez-Pech et al., 2020). En este estudio también se proveen imágenes de los huevos de tardígrados recolectados, los cuales son elementos importantes para la identificación a nivel especie (Kaczmarek et al., 2017, 2020; Kaczmarek & Michalczyk, 2017; Morek et



of biodiversity with a unique composition. This was observed in the present study, as it was found that citrus crops (regardless of the biotope type), an environment altered and modified by human action, can harbor high levels of tardigrade richness, diversity, and abundance compared to vegetation fragments. In terms of diversity ( $H'$ ), there was generally no variation between lichen and moss samples from the same plots, with variation only observed during the September 2018 sampling in the plantation area. This agrees with findings by Dastych (1988) in Poland, who discovered that rather than ecosystem type (e.g., forest or soil types), the microenvironment type was the factor most related to the variation in the diversity and abundance of limno-terrestrial tardigrades, not the bryophyte species to which they were associated. This has also been observed in boreal forests in Norway, where tardigrade communities varied more regarding the substrate (leaf litter, lichen, and bryophytes) than with the type of ecosystem (Guidetti et al., 2024).

This study also documented differences in the availability of habitats for tardigrades in the environments studied. In the case of citrus, the availability of lichen and moss was 100 % during both sampling periods, while in the forest fragment, the presence of lichen and moss was recorded in 33 % and 55 % of the sampled trees, respectively. Therefore, it is possible that the citrus crop provides greater habitat availability for tardigrades compared to the vegetation fragment. In Costa Rica, Kaczmarek et al. (2011) found similar results when comparing modified environments to natural ones and concluded that the former may harbor greater diversity. However, the researchers demonstrated that this fact was strongly correlated with humidity (and less so with plant and substrate types). In contrast, in this study, the MDS values showed little correlation between the structure of the tardigrade community and humidity levels. On the other hand, when analyzing the MDS results between physical (humidity and temperature), chemical (pH) parameters, and diversity, it was found that pH correlated better with species arrangement. These results agree with those of Utsugi (1984) and Johansson et al. (2011), who mentioned that pH is a parameter that drives the variation in limno-terrestrial tardigrade diversity. Utsugi (1984) considered that tardigrades prefer environments with a neutral pH (6.5-8.0), and Johansson et al. (2011) found that tardigrades in rural environments prefer slightly acidic pH levels (4.5 to 6.0); in this study, the values were slightly acidic and neutral (pH 5.1-7.4).

On the other hand, considering the postulation by Meyer et al. (2013) regarding the uniqueness of the tardigrade community in anthropogenic environments, it is important to add that some taxa may adapt better to these environments and, in turn, show high dominance. This could also influence the determination of the tardigrade community structure in rural environments,

al., 2016). Esta información es importante para el uso en futuros estudios en la península de Yucatán.

En cuanto a la ecología de tardígrados urbanos y rurales, Meyer et al. (2013) consideran que los ambientes originados en el Antropoceno pueden permitir el mantenimiento de la biodiversidad con una composición única. Esto se constató en el presente estudio, ya que se pudo observar como el cultivo de cítricos (sin importar el tipo de biotopo), el cual es un ambiente intervenido y modificado por acción antropogénica, puede albergar niveles altos de riqueza, diversidad y abundancia de tardígrados frente al fragmento de vegetación. En cuanto a la diversidad ( $H'$ ), en general, no hubo variación entre muestras de líquen y musgo de las mismas parcelas, solo se observó variación durante el muestreo de septiembre de 2018 en el área de cultivo. Esto coincide con lo encontrado por Dastych (1988) en Polonia, quien encontró que, más que el tipo de ecosistema (v. g., tipos de bosque o suelo), el tipo de microambiente fue el factor que se relacionó con la variación de la diversidad y abundancia de tardígrados limnoterrestres y no la especie de briofita a la cual se asociaron. Esto también se ha observado en bosques boreales de Noruega, donde las comunidades de tardígrados variaron más con respecto al sustrato (hojarasca, líquen y briofitas) que con el tipo de ecosistema (Guidetti et al., 2024).

En el presente estudio también se documentó diferencia entre la disponibilidad de hábitats para tardígrados en los ambientes estudiados. En el caso del cultivo de cítricos, la disponibilidad de líquen y musgo fue del 100 % en las dos temporalidades de muestreo, mientras que, en el fragmento de selva, la presencia de líquen y musgo se registró en 33 y 55 % de los árboles muestreados, respectivamente. Por tanto, es posible que el cultivo de cítricos provea mayor disponibilidad de hábitats para tardígrados frente al fragmento de vegetación. En Costa Rica, Kaczmarek et al. (2011) encontraron algo similar cuando compararon ambientes modificados frente a ambientes naturales y concluyeron que los primeros pueden albergar mayor diversidad. No obstante, los investigadores demostraron que este hecho estuvo ampliamente correlacionado con la humedad (y una menor correlación con los tipos de planta y sustrato). Sin embargo, en este estudio, los valores del MDS mostraron poca correlación entre la estructura de la comunidad de tardígrados y los valores de humedad. Por otro lado, al analizar los resultados de los MDS entre parámetros físicos (humedad y temperatura), químicos (pH) y la diversidad, se encontró que el pH se correlaciona mejor con el arreglo de especies. Estos resultados coinciden con los de Utsugi (1984) y Johansson et al. (2011), quienes mencionan que el pH es un parámetro que dirige la variación de la diversidad de tardígrados limnoterrestres. Utsugi (1984) consideró que los tardígrados prefieren ambientes con

as documented by Gonzales-Reyes et al. (2016), who, like in the present study, identified the genus *Macrobiotus* as dominant. The results showed clear differentiation of tardigrade communities between the two environments in September 2018, with significant difference ( $P < 0.05$ ) in overall diversity by study month. This demonstrates that the diversity of limno-terrestrial tardigrades is affected by time. This study covered the rainy season and the 'nortes' season; therefore, the observed changes in diversity between the studied environments and time periods could be affected by changes in climatic variables.

## Conclusions

The updated list of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo consists of 14 species; furthermore, the coastal mangrove forest is added to the list of environments for these animals in the region. The richness and Shannon-Wiener diversity were higher in the citrus plantation than in the evergreen forest fragment, suggesting that tardigrades adapt well to anthropogenic environments. The results indicate that the patterns of tardigrade diversity in modified and natural environments are influenced by multifactorial processes. At the landscape level, the type of ecosystem is a factor that determines habitat availability for tardigrades. Additionally, microenvironmental conditions such as pH, and to a lesser extent humidity, also influence the structure and composition of limno-terrestrial tardigrade communities.

## Acknowledgments

The first author thanks the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación for the funding provided during the development of the study (CVU 77783). The fifth author thanks the institutional project 5805.19-P from the *Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Chetumal* for the funding provided. The authors also thank Dr. Alberto de Jesús Navarrete and the Colegio de la Frontera Sur for providing the facilities and equipment from Laboratorio de Pesquerías Sección Meiofauna, during the identification of the taxa; thanks to M. C. Héctor Ortiz León for the support given at the Laboratorio de Zoología del Tecnológico Nacional de México, campus Chetumal, during sample separation; and to the anonymous reviewers for their feedback on this article.

## 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.

*End of English version*

pH neutro (6.5-8.0) y Johansson et al. (2011) encontraron que los tardígrados en ambientes rurales prefieren niveles de pH ligeramente ácidos (4.5 a 6.0); en el presente estudio, los valores fueron ligeramente ácidos y neutros (pH 5.1-7.4).

Por otra parte, considerando lo postulado por Meyer et al. (2013), sobre lo singular de la comunidad de tardígrados en ambientes antrópicos, es importante agregar que algunos taxones pueden adaptarse mejor en estos ambientes y, a su vez, mostrar alta dominancia. Esto podría influir también al determinar la estructura de la comunidad de tardígrados en ambientes rurales, tal como han documentado Gonzales-Reyes et al. (2016), donde al igual que en el presente estudio, señalan al género *Macrobiotus* como dominante. Los resultados mostraron clara diferenciación de las comunidades de tardígrados entre los dos ambientes en septiembre del 2018 y diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en las diversidades globales por mes de estudio. Lo anterior demuestra que la diversidad de tardígrados limnoterrestres es afectada por el tiempo. Este estudio abarcó las temporadas de lluvias y 'nortes'; por lo tanto, los cambios en la diversidad observada entre los ambientes estudiados y la temporalidad podrían estar sujetos a los cambios de las variables climáticas.

## Conclusiones

El listado actualizado de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo está conformado por 14 especies; asimismo, se adiciona el bosque de manglar costero a la lista de ambientes de dichos animales en la entidad. La riqueza y diversidad de Shannon-Wiener fue mayor en el cultivo de cítricos que en el fragmento de selva mediana subperennifolia, lo cual sugiere que los tardígrados se adaptan bien a los ambientes antrópicos. Los resultados indican que los patrones de diversidad de tardígrados en ambientes modificados y naturales obedecen a procesos multifactoriales. A nivel de paisaje, el tipo de ecosistema es un factor que determina la disponibilidad de hábitats para tardígrados. Por otra parte, las condiciones microambientales como el pH y, en menor grado, la humedad, también influyen en la estructura y composición de las comunidades de tardígrados limnoterrestres.

## Agradecimientos

El primer autor agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por el financiamiento durante el desarrollo del estudio (CVU 77783). El quinto autor agradece al proyecto institucional 5805.19-P del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Chetumal por su financiamiento. Agradecemos también al Dr. Alberto

## References / Referencias

- Anguas-Escalante, A., de Jesús-Navarrete, A., Demilio, E., Perez-Pech, W. A., & Hansen, J. G. (2020). A new species of Tardigrada from a Caribbean reef lagoon, *Florarctus yucatanensis* sp. nov. (Halechiniscidae: Florarctinae). *CBM - Cahiers de Biologie Marine*, 61, 377–385. <https://doi.org/10.21411/CBM.A.CD1B185A>
- Anguas-Escalante, A., Pérez-Pech, W. A., Guidetti, R., Cutz-Pool, L. Q., & Ortiz León, H. (2018). Tardígrados asociados a una plantación de cítricos de traspatio en la comunidad de El Palmar en Quintana Roo, México. *Investigación y Ciencia*, 73, (26), 20–26. <https://doi.org/10.33064/iycuaa201873203>
- Bartels, P. J., Apodaca, J. J., Mora, C., & Nelson, D. R. (2016). A global biodiversity estimates of a poorly known taxon: phylum Tardigrada. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(4), 730–736. <https://doi.org/10.1111/zoj.12441>
- Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2006). *PRIMER V6: User Manual/tutorial*. PRIMER-E. Plymouth.
- Claxton, S. K. (1998). A revision of the genus *Minibiotus* (Tardigrada: Macrobiotidae) with descriptions of eleven new species from Australia. *Records of the Australian Museum*, 50(2), 125–160. <https://doi.org/10.3853/j.0067-1975.50.1998.1276>
- Cutz-Pool, L., Crisanto, J., Pérez-Pech, W. A., Anguas-Escalante, A., & Guidetti, R. (2019). Caracterización de la fauna de tardígrados (Ecdysozoa: Tardigrada) de liquen y musgo en dos sitios con diferente uso de suelo en Quintana Roo, México. En W. Cetzal-Ix, F. Casanova-Lugo, A. J. Chay-Canul, & J. F. Martínez-Puc (Eds.), *Agroecosistemas tropicales: Conservación de recursos naturales y seguridad alimentaria* (1.ª ed., pp. 193–200). Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Chiná - Instituto Tecnológico de la Zona Maya.
- Dastyh, H. (1988). *The Tardigrada of Poland*. Wyd. Naukowe.
- Dueñas-Cedillo, A., Martínez-Méndez, E., García-Román, J., Armendáriz-Toledano, F., & Ruiz, E. (2020). Tardigrades from Iztaccíhuatl Volcano (Trans-Mexican Volcanic Belt), with the description of *Minibiotus citlalium* sp. nov. (Eutardigrada: Macrobiotidae). *Diversity*, 12(271), 2–24. <https://doi.org/10.3390/d12070271>
- Gąsiorek, P. (2023). Catch me if you can, or how paradigms of tardigrade biogeography evolved from cosmopolitanism to 'localism'. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 202(2), zlad191. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad191>
- García-Román, J., Dueñas-Cedillo, A., Cervantes-Espinoza, M., Flores-Martínez, J. J., Vargas-Mendoza, C. F., Ruiz, E. A., & Armendáriz-Toledano, F. (2022). A strategy to provide a present and future scenario of Mexican biodiversity of tardigrada. *Diversity*, 14(4), 280. <https://doi.org/10.3390/d14040280>
- González-Reyes, A., Acosta, X., Corronca, J., Rocha, M., Doma I., & Repp, E. Y. (2016). Evaluación de la diversidad en comunidades de tardígrados (Ecdysozoa, Tardigrada) en hábitats urbano y rural de la ciudad de Salta (Argentina). *Iheringia Série Zoologia*, 106, 1–8. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2016026>
- de Jesús Navarrete y al Colegio de la Frontera Sur por facilitar las instalaciones y equipo del Laboratorio de Pesquerías Sección Meiofauna durante la identificación de los taxones; al M. C. Héctor Ortiz León por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Zoología del Tecnológico Nacional de México, campus Chetumal, durante la separación de muestras; y a los revisores anónimos por sus recomendaciones al artículo.

## Declaración de conflicto 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.

## Fin de la versión en español

- Guidetti, R., Cesari, M., Bertolani, R., Altiero, T., & Rebecchi, L. (2019). High diversity in species, reproductive modes and distribution within the *Paramacrobiotus richtersi* complex (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Zoological Letters*, 5(1), 2–28. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0113-z>
- Guidetti, R., Peluffo, J. R., Rocha, A. M., Cesari, M., & de Peluffo, M. C. M. (2013). The morphological and molecular analyses of a new South American urban tardigrade offer new insights on the biological meaning of the *Macrobiotus hufelandi* group of species (Tardigrada: Macrobiotidae). *Journal of Natural History*, 47, 2409–2426. <https://doi.org/10.1080/00222933.2013.800610>
- Guidetti, R., Ingemar Jönsson, K., Kaczmarek, Ł., Meier, T., Speed, J. D., Prestø, T., Stur, E., Topstad, L., Cesari, M., Roszkowska, M., Zawierucha, K., hassel, K., & Ekrem, T. (2024). Tardigrade diversity and community composition across Norwegian boreal forests. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 200(1), 156–171. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad136>
- Hammer, O., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package education and analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(9), 2–9. [https://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf)
- Johansson, C., Calloway, S., Miller, W. R., & Linder, E. T. (2011). Are urban and rural tardigrade (Tardigrada) communities distinct and determined by pH: a case study from Fresno County, California. *The Pan-Pacific Entomologist*, 87, 86–98. <https://doi.org/10.3956/2010-27.1>
- Kaczmarek, Ł., Bartylak, T., Stec, D., Kulpa, A., Kepel, M., Kepel, A., & Roszkowska, M. (2020). Revisiting the genus *Mesobiotus* (Eutardigrada, Macrobiotidae)—remarks, updated dichotomous key and an integrative description of new species from Madagascar. *Zoologischer Anzeiger*, 287, 121–146. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2020.05.003>
- Kaczmarek, Ł., Gawlak, M., Bartels, P. J., Nelson, D. R., & Roszkowska, M. (2017). Revision of the genus *Paramacrobiotus* Guidetti et al., 2009 with the description



- of a new species, re-descriptions and a key. *Annales Zoologici*, 67, 627–657. <https://doi.org/10.3161/00034541A NZ2017.67.4.001>
- Kaczmarek, Ł., Goldyn, B., McInnes, S. J., & Michalczyk, Ł. (2016). Diversity of limno-terrestrial tardigrades of the Americas in relation to the Great American Biotic Interchange hypothesis (GABI). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(4), 737–746. <https://doi.org/10.1111/zoj.12422>
- Kaczmarek, Ł., Goldyn, B., Welnicz, W., & Michalczyk, Ł. (2011). Ecological factors determining Tardigrada distribution in Costa Rica. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49, 78–83. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00603.x>
- Kaczmarek, Ł., & Michalczyk, Ł. (2017). The *Macrobotus hufelandi* group (Tardigrada) revisited. *Zootaxa*, 4363, 101–123. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4363.1.4>
- Kayastha, P., Mioduchowska, M., Warguła, J., & Kaczmarek, Ł. (2023). A review on the genus *Paramacrobotus* (Tardigrada) with a new diagnostic key. *Diversity*, 15(9), 977. <https://doi.org/10.3390/d15090977>
- Meyer, H. A., Hinton, J. G., & Samletzka, C. A. (2013). Water bears in the Anthropocene: a comparison of urban and woodland tardigrade (Phylum Tardigrada) communities in Southwestern Louisiana, USA. *Journal of Limnology*, 72, 123–127. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s1.e15>
- Mogle, M. J., Kimball, S. A., Miller, W. R., & McKown, R. D. (2018). Evidence of avian-mediated long distance dispersal in American tardigrades. *PeerJ*, 6, e5035. <https://doi.org/10.7717/peerj.5035>
- Morek, W., Gąsiorek, P., Stec, D., Blagden, B., & Michalczyk, Ł. (2016). Experimental taxonomy exposes ontogenetic variability and elucidates the taxonomic value of claw configuration in *Milnesium Doyère*, 1840 (Tardigrada: Eutardigrada: Apochela). *Contributions to Zoology*, 85(2), 173–200. <https://doi.org/10.1163/18759866-08502003>
- Morek, W., Surmacz, B., López-López, A., & Michalczyk, Ł. (2021). “Everything is not everywhere”: Time-calibrated phylogeography of the genus *Milnesium* (Tardigrada). *Molecular Ecology*, 30(14), 3590–3609. <https://doi.org/10.1111/mec.15951>
- Morek, W., Wałach, K., & Michalczyk, Ł. (2022). Rough backs: taxonomic value of epicuticular sculpturing in the genus *Milnesium Doyère*, 1840 (Tardigrada: Apochela). *Scientific Reports*, 12(1), 9857. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10758-z>
- Moreno-Talamantes, A., Roszkowska, M., Ríos Guayasamín, P., Flores Maldonado, J. J., & Kaczmarek, Ł. (2015). First record of *Dactylobiotus parthenogeneticus* Bertolani, 1982 (Eutardigrada: Murrayidae) in Mexico. *Check List*, 11(4), 1723. <https://doi.org/10.15560/11.4.1723>
- Moreno-Talamantes, A., Roszkowska, M., García-Aranda, M. A., Flores-Maldonado, J. J., & Kaczmarek, Ł. (2019). Current knowledge on Mexican tardigrades with a description of *Milnesium cassandrae* sp. nov. (Eutardigrada: Milnesiidae) and discussion on the taxonomic value of dorsal pseudoplates in the genus *Milnesium Doyère*, 1840. *Zootaxa*, 4695, 501–524. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4695.5.5>
- Moreno-Talamantes A., & León-Espinosa G. (2019). Nuevo registro de *Diaforobiotus islandicus* (Richters, 1904) (EUTARDIGRADA: RICHTERSIIDAE) para México. *Arido-Ciencia*, 6(1), 5–12. <http://fcbujed.com/aridociencia/numeros/2019/VIVN1/articulo2.pdf>
- Nelson, D., Guidetti, R., & Rebecchi, L. (2015). Phylum Tardigrada. En J. Thorp, & D. C. Rogers (Eds.), *Freshwater invertebrates* (vol. I 4th ed., pp. 347–380). San Diego: Academic Press (Elsevier Inc.). <https://www.sciencedirect.com/book/9780123850263/thorp-and-covichs-freshwater-invertebrates>
- Núñez, P. G., León-Espinosa, G. A., Vázquez, R., Peña-Salinas, M. E., Rodríguez-Almaraz, G. A., & Moreno-Talamantes, A. (2021). First tardigrade records from San Pedro Mártir, Baja California, Mexico. *Check List*, 17, 1131. <https://doi.org/10.15560/17.4.1131>
- Pérez-Pech, W. A., Anguas-Escalante, A., Cutz-Pool, L. Q., & Guidetti, R. (2017). *Doryphoribius chetumalensis* sp. nov. (Eutardigrada: Isohypsibiidae) a new tardigrade species discovered in an unusual habitat of urban areas of Mexico. *Zootaxa*, 4344, 345–356. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4344.2.9>
- Pérez-Pech, W. A., Cutz-Pool, L. Q., Guidetti, R., & Blanco-Piñón, A. (2016). Primer registro genérico de tardígrados, habitantes del área urbana de Chetumal Quintana Roo, México. *Entomología Mexicana*, 3, 912–918. <https://www.acaentmex.org/entomologia/revista/2016/SM/Em%20912-918.pdf>
- Pérez-Pech, W. A., Demilio, E., Anguas-Escalante, A., & Hansen, J. G. (2020). Marine Tardigrada from the Mexican Caribbean with the description of *Styraconyx robertoi* sp. nov. (Arthrotardigrada: Styraconyxidae). *Zootaxa*, 4731(4). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4731.4.3>
- Pilato, G. (2006). Remarks on the *Macrobotus polyopus* group, with the description of two new species (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Zootaxa*, 1298(1), 37–47. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5616731>
- Pilato, G., & Kaczmarek, Ł. (2007). *Macrobotus alvaroi*, a new species of eutardigrade (Tardigrada, Macrobiotidae) of the polyopus group from Costa Rica (Central America). *Zootaxa*, 1479(1), 1–7. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1479.1.1>
- Utsugi, K. (1984). Tardigrades found in the mosses of cities of Japan. *Zoological Science* 1, 999.

