



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

EMILIANA BROTTTO GUIDETTI

TAXONOMIA INTEGRATIVA DE UMA NOVA ESPÉCIE DE
TARDÍGRADO LIMNOTERRESTRE (GÊNERO *MILNESIUM*
DOYÈRE 1840), A PRIMEIRA ESPÉCIE ‘INDÍGENA’
AMPLILOCADA NA AMÉRICA DO SUL

INTEGRATIVE TAXONOMY OF A NEW SPECIES OF
LIMNOTERRESTRIAL TARDIGRADE (GENUS *MILNESIUM*
DOYÈRE 1840), THE FIRST ‘INDIGENOUS’ SPECIES
WIDESPREAD IN SOUTH AMERICA

CAMPINAS

2025

EMILIANA BROTTTO GUIDETTI

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE UMA NOVA ESPÉCIE DE
TARDÍGRADO LIMNOTERRESTRE (GÊNERO *MILNESIUM* DOYÈRE
1840), A PRIMEIRA ESPÉCIE ‘INDÍGENA’ AMPLILOCADA NA
AMÉRICA DO SUL**

**INTEGRATIVE TAXONOMY OF A NEW SPECIES OF
LIMNOTERRESTRIAL TARDIGRADE (GENUS *MILNESIUM*
DOYÈRE 1840), THE FIRST ‘INDIGENOUS’ SPECIES WIDESPREAD
IN SOUTH AMERICA**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Biologia Animal, na área de
Biodiversidade Animal.*

*Dissertation presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for the
degree of Master in Animal Biology, in the
area of Animal Biodiversity.*

Orientador: Prof. Dr. André Rinaldo Senna Garraffoni

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA EMILIANA BROTTTO GUIDETTI E
ORIENTADA PELO PROF. DR. ANDRÉ RINALDO
SENNA GARRAFFONI.

CAMPINAS

2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G941t Guidetti, Emiliana Brotto, 1997-
Taxonomia integrativa de uma nova espécie de tardígrado limnoterrestre (gênero *Milnesium* Doyère 1840), a primeira espécie 'indígena' amplilocada na América do Sul / Emiliana Brotto Guidetti. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: André Rinaldo Senna Garraffoni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Tardígrado - América Latina. 2. Meiofauna. I. Garraffoni, André Rinaldo Senna, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Integrative taxonomy of a new species of limnoterrestrial tardigrade (genus *Milnesium* Doyère 1840), the first 'indigenous' species widespread in South America.

Palavras-chave em inglês:

Tardigrada - Latin America

Meiofauna

Área de concentração: Biodiversidade Animal

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

André Rinaldo Senna Garraffoni [Orientador]

Rodolfo Corrêa de Barros

Ariane Campos

Data de defesa: 31-03-2025

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

Não se aplica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2082-8644>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3451113672922738>

BANCA DA APROVAÇÃO

Prof. Dr. André Rinaldo Senna Garraffoni

Prof. Dr. Rodolfo Corrêa de Barros

Profª. Dra. Arianne Campos

A Ata da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

| AGRADECIMENTOS

Eu agradeço acima de tudo à minha família, por todo o suporte que me ofereceram desde sempre. Especialmente agradeço à minha mãe, Ana Lúcia, meu pai, Marcelo, e meu irmão, Leonardo, pelos sacrifícios que eles fizeram para que eu pudesse chegar onde cheguei. A força e a coragem deles são imensuráveis. Mamãe e papai, obrigada por me criarem “para o mundo”. Devo dedicar um agradecimento especial também aos meus avós paternos e maternos que pavimentaram o caminho antes de mim. Agradeço ainda aos demais familiares e até aos “agregados” da família que de um jeito ou de outro estiveram presentes em minha jornada, sempre dispostos a me ajudar como pudessem. E por fim, agradeço à minha sobrinha Celine, que ainda nem consegue ler isso, mas já me ensinou que não importa o que aconteça, a vida sempre pode nos surpreender com algo bom.

Dedico outra grande parte da minha gratidão aos amigos que fiz ao longo da minha formação acadêmica, e que fizeram parte dos momentos mais malucos e felizes da minha vida: Alan Rodrigo, Joel, Victor (Picasso), Carol (Fulaninha), Marina, e tantos outros que cruzaram meu caminho. Mas sou grata sobretudo aos que estiveram comigo também nos momentos mais difíceis, ouvindo meus desabafos e me dando os melhores conselhos: Marlon, Nathan, Luísa, Natália, Cecília e Klebinho. No Laboratório de Evolução de Organismos Meiofaunais (LEOM) encontrei outros amigos que também me ajudaram muito: Pedro (Remy), Axell, Ariane, Paola e Érika.

Cito um agradecimento talvez improvável, que vai além dos livros e muros da universidade, à toda a equipe do Bronco Burger, onde encontrei pessoas muito dedicadas, que mesmo não entendendo bem o que eu faço, me admiram e me incentivam. Destaco a Milena, o Davi, o Gabriel, a Brenda e principalmente o João Vitor Milani, que me fez enxergar o que eu mereço.

Em 2017 eu procurei o professor André Garraffoni porque estava fascinada pela visão que ele têm sobre a diversidade e história da vida, e porque ele poderia me ajudar a desvendar o mundo microscópico dos “pequenos e quase sempre esquecidos metazoários”. Ele não hesitou em aceitar o desafio de desbravar comigo uma linha de pesquisa que até então era completamente nova para nós. Portanto, agradeço a valiosa orientação que dedicou a mim durante todos esses anos. Aproveito para agradecer também a colaboração que foi estabelecida durante a execução desse projeto, com o sempre muito solícito Witold Morek (Witek), pois sua ajuda foi essencial.

Por fim, agradeço a Universidade Estadual de Campinas e ao Instituto de Biologia, que por muito tempo foram minha segunda casa, onde encontrei a infraestrutura, recursos e conhecimentos tão necessários para minha formação pessoal e profissional. Essa gratidão se estende principalmente às equipes do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME), do Laboratório de Estudos Cromossômicos (LabEsC), do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), e do Museu de Diversidade Biológica (MDBio), todos da Unicamp. Agradeço também o financiamento concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (PROTAX 130379/2021-2) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2014/23856-0; 2018/10313-0; 2023/05724-9). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“I looked around in a blood-soaked gown

And I saw something they can't take away

'Cause there were pages turned with the bridges burned

Everything you lose is a step you take

So make the friendship bracelets, take the moment and taste it

You've got no reason to be afraid

You're on your own, kid

Yeah, you can face this.”

- *Taylor Swift (You're on Your Own, Kid)*

| RESUMO

O filo Tardigrada compreende animais invertebrados, microscópicos (50–1200µm de comprimento), de simetria bilateral, que possuem o corpo revestido por uma cutícula quitinosa e caracterizam-se pela presença de quatro pares de pernas, geralmente com garras. Eles vivem em diversos ambientes aquáticos e terrestres úmidos, principalmente lagos, mares, musgos e líquens. Atualmente são conhecidas cerca de 1400 espécies de tardígrados ao redor do mundo, mas o entendimento de sua diversidade e distribuição ainda é bastante limitado se comparado a outros grupos de invertebrados. As lacunas no conhecimento taxonômico e ecológico do filo se devem em grande parte à carência de especialistas estudando o grupo e ao baixo número de coletas e trabalhos realizados em algumas áreas, como na região Neotropical. Além disso, a combinação de estudos morfológicos, morfométricos e moleculares na taxonomia atual vêm demonstrando que muitas espécies consideradas cosmopolitas no passado representam, na verdade, complexos de espécies. A espécie *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840 é um exemplo disso. A maior parte dos registros feitos nas Américas datam do período em que essa espécie era considerada extremamente cosmopolita e pensava-se que o gênero *Milnesium* Doyère, 1840 apresentava uma baixa diversidade, devido às poucas variações morfológicas observadas até então. Entretanto, nas últimas décadas, o uso integrado de técnicas de estudo ampliou os critérios taxonômicos utilizados na identificação e descrição desses animais, gerando um aumento no número de descrições de novas espécies. Apesar dos avanços, muitas regiões permanecem pouco estudadas. A grande extensão territorial, o clima e a diversidade de biomas da América do Sul indicam um potencial significativo para abrigar tardígrados ainda desconhecidos. A partir de coletas de musgo e líquen realizadas em Campinas (SP, Brasil) e outras amostras da Argentina e Guiana Francesa obtidas através de uma colaboração internacional, este estudo visou realizar a descrição de uma nova espécie de tardígrado do gênero *Milnesium* que foi encontrada. Para isso, foram utilizadas múltiplas abordagens, como microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, medição de estruturas morfológicas de importância taxonômica e análise molecular com os genes 18S, 28S e COI. Posteriormente, mais coletas foram realizadas e essa espécie foi identificada morfológica- e molecularmente em novas localidades do Brasil e da Argentina. Essa é, portanto, a primeira espécie de tardígrado limnoterrestre descrita originariamente na região neotropical, de forma integrativa e com ampla distribuição na América do Sul.

| ABSTRACT

The phylum Tardigrada comprises microscopic invertebrate animals (50–1200µm in length), bilaterally symmetrical, with the body covered by a chitinous cuticle and characterized by the presence of four pairs of legs, usually with claws. They live in various aquatic and humid terrestrial environments, mainly lakes, seas, mosses and lichens. Currently, approximately 1400 species of tardigrades are known around the world, but the understanding of their diversity and distribution is still quite limited when compared to other groups of invertebrates. The gaps in taxonomic and ecological knowledge of the phylum are largely due to the lack of specialists studying the group and the low number of sampling and studies carried out in some areas, such as the Neotropics. In addition, the combination of morphological, morphometric and molecular studies in current taxonomy has demonstrated that many species considered cosmopolitan in the past actually represent species complexes. The species *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840 is an example of this. Most of the records made in the Americas date back to the period when this species was considered extremely cosmopolitan and it was thought that the genus *Milnesium* Doyère, 1840 presented low diversity, due to the few morphological variations observed until then. However, in recent decades, the integrated use of study techniques has expanded the taxonomic criteria used in the identification and description of these animals, generating an increase in the number of descriptions of new species. Despite the advances, many regions remain little studied. The large territorial extension, climate and diversity of biomes of South America indicate a significant potential for harboring as yet unknown tardigrades. Based on samples of moss and lichen collected in Campinas (SP, Brazil) and other specific samples from Argentina and French Guiana obtained through an international collaboration, this study aimed to describe a new species of tardigrade of the genus *Milnesium* that was discovered. For this purpose, multiple approaches were used, such as light microscopy and scanning electron microscopy, measurement of morphological structures of taxonomic importance and molecular analysis with the 18S, 28S and COI genes. Subsequently, more samples were collected and analyzed and this species was identified morphologically and molecularly in new locations in Brazil and Argentina. This is, therefore, the first species of limnoterrestrial tardigrade originally described in the Neotropical region, with integrative methods and with a wide distribution in South America.

| SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
I. Panorama geral do filo Tardigrada	12
II. O “estado da arte”: tardígrados limnoterrestres da América do Sul	15
III. O caso <i>Milnesium</i>	16
OBJETIVOS	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
I. Coletas, triagem e armazenamento	20
II. Análise morfológica	21
III. Análise molecular	22
IV. Depósito de material	24
RESULTADOS	26
Capítulo 1	29
Abstract	29
Introduction	30
Material and Methods	32
Results	35
Discussion	41
Acknowledgements	43
References	43
Figures and Tables	52
Capítulo 2	63
Resumo	63
Introdução	64
Material e Métodos	66
Resultados	68
Discussão	69
Agradecimentos	71
Referências	72
Figuras e Tabelas	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS	94

ANEXOS	104
I. Declaração de Direitos Autorais	105
II. Declaração de Bioética e Biossegurança	106

| INTRODUÇÃO

I. Panorama geral do filo Tardigrada

Os tardígrados são animais invertebrados que apresentam corpo de simetria bilateral, em geral cilíndrico e convexo dorsalmente, tendo em média 250-500µm de comprimento (Nelson et al., 2015). Esses organismos são aquáticos, pois precisam estar cercados por água para estarem em seu estado ativo, sendo capazes de se alimentar, se locomover, crescer e se reproduzir. No entanto, inúmeras espécies dominaram ambientes terrestres, onde suportam os períodos em que não há água disponível, e nesse caso são denominadas semiterrestres ou limnoterrestres (Møbjerg et al., 2018). Assim, os tardígrados estão distribuídos mundialmente e são encontrados em uma grande variedade de *habitats* terrestres e aquáticos, de florestas tropicais a desertos áridos e polares, de topos de montanhas a grandes profundidades oceânicas (Kaczmarek et al., 2015).

A morfologia geral desses animais é caracterizada pela presença de quatro pares de apêndices locomotores, chamados de lobópodes (Nelson et al., 2015). Os três primeiros pares de lobópodes estão direcionados anteriormente e são usados para locomoção, enquanto o quarto par é direcionado posteriormente e auxilia na retenção ao substrato (Møbjerg et al., 2018). Na extremidade dos apêndices, os tardígrados geralmente possuem garras, e no caso das espécies marinhas, podem apresentar também dígitos e discos adesivos. Essas estruturas também auxiliam na locomoção e variam em forma e tamanho nas diferentes espécies.

Outra característica comum desses organismos é a presença de um complexo aparelho bucofaríngeo, formado principalmente por boca, tubo bucal, um par de estiletos e uma faringe muscular. A boca, localizada terminal-ventralmente, pode apresentar estruturas sensoriais ao seu redor, como lamelas e papilas, e se move para frente e para trás como um telescópio. Os estiletos são estruturas rígidas posicionadas no tubo bucal, que se projetam através da abertura da boca e ajudam a perfurar o alimento (Møbjerg et al., 2018). A forma e as dimensões do aparelho bucal dos tardígrados pode estar diretamente relacionada a seus hábitos alimentares (Tůmová et al., 2022). Normalmente eles são generalistas e se alimentam de bactérias, fungos e células vegetais e animais que encontram no ambiente, mas algumas espécies são conhecidas por serem estritamente herbívoras ou carnívoras, e a ingestão de alimentos específicos afeta suas taxas de sobrevivência e reprodução (Bryndová et al., 2020).

A reprodução se dá por meio de ovos e pode ocorrer através do encontro de gametas e fertilização ou por partenogênese (quando o ovo não é fertilizado) (Altiero et al., 2018). Os

tardígrados marinhos são quase sempre gonocóricos (bissexuais) e podem inclusive apresentar dimorfismo sexual; já os limnoterrestres são mais comumente unissexuais, isto é, fêmeas que se reproduzem apenas por partenogênese (telitoquia). O hermafroditismo também ocorre, mas é menos frequente (Nelson et al., 2015). Os ovos variam muito de acordo com o táxon, podendo ser totalmente lisos ou com diversas ornamentações que auxiliam na aderência ao substrato onde são depositados e na dispersão. Quando o desenvolvimento embrionário está completo, o tardígrado emerge do ovo já semelhante ao adulto, embora ainda não seja sexualmente maduro (Nelson et al., 2015, Altiero et al., 2018). No caso de algumas espécies, os indivíduos jovens podem apresentar diferenças morfológicas em relação aos adultos. Essa variabilidade ontogenética, bem como as características dos ovos, são informações importantes para a identificação das espécies (Surmacz et al., 2019, Brandoli et al., 2024).

O corpo dos tardígrados é coberto por um tegumento composto de uma cutícula contendo quitina e uma epiderme subjacente de camada única, secretora dessa cutícula (Baccetti & Rosati, 1971; Greven & Greven, 1987). As espécies variam de cor, podendo ser totalmente transparentes ou brancas, amarelas, verdes, vermelhas, laranja e marrons. A coloração pode estar concentrada nas células do tegumento ou no conteúdo do intestino (alimento ingerido). A cutícula pode ser basicamente subdividida em três camadas: a epicutícula (externa), a intracutícula (mediana) e a procutícula (interna) (Kristensen & Neuhaus, 1999; Weglarska, 1989). Existe uma grande diversidade de espessuras, formas e ornamentações na cutícula como um todo, tanto no próprio espécime (por exemplo, dorso e ventre) quanto entre diferentes espécies (Czerneková & Vinopal, 2021).

A cutícula está intimamente associada ao ciclo de vida desses animais, pois relaciona-se a aspectos reprodutivos e ao crescimento. Periodicamente, em um processo denominado muda ou ecdise, a cutícula que reveste o corpo externamente e alguns órgãos internos (partes esclerificadas do aparelho bucofaríngeo e reto), bem como as garras, são eliminadas e secretadas novamente, permitindo o crescimento do animal (Møbjerg et al., 2018). A ecdise, entre outras características, inclui o filo Tardigrada no superfilo Ecdysozoa, onde dados morfológicos e moleculares dão suporte para uma relação próxima com os Arthropoda e Onychophora, embora as relações exatas dentro do clado ainda sejam discutidas (por exemplo: Hipótese Lobopodia e Hipótese Tactopoda) (Telford et al., 2008; Jørgensen et al., 2018).

As primeiras menções aos tardígrados na literatura foram publicadas em uma rápida sucessão em um período de nove anos, no século XVIII (Goeze, 1773; Corti, 1774; Eichhorn,

1775; Spallanzani, 1776; Müller, 1785). Portanto, é muito provável que os tardígrados tenham sido descobertos independentemente várias vezes, mas o primeiro registro formal data de 1773, feito por Johann A. E. Goeze, que se refere a esses animais como “Kleiner Wasser Bär” ou “pequenos ursos d’água” (Møbjerg et al., 2011). O termo “il Tardigrado” foi introduzido três anos depois por Lazzaro Spallanzani, em referência ao movimento lento de seus lobópodes (do latim, *tardus* = “lento”; *gradus* = “passos”) (Nelson et al., 2015). Só em 1962 Tardigrada foi reconhecido como um filo (Ramazzotti, 1962).

Desde as primeiras observações, os tardígrados intrigam por sua notável capacidade de tolerar a exposição a vários extremos químicos e físicos (Wełnicz et al., 2011). Corti (1774), por exemplo, notou algumas adaptações desses organismos quando observou que eles podiam ser revividos após a dessecação (Kinchin, 1994). Adaptações semelhantes a condições extremas também são conhecidas para outros metazoários, como algumas espécies de artrópodes, nematóides e rotíferos, mas os tardígrados são excepcionais entre eles.

Os mecanismos fisiológicos e genéticos envolvidos nessa resistência podem variar de acordo com cada espécie de tardígrado e com os estímulos ambientais, portanto esses processos ainda não são completamente compreendidos (Wełnicz et al., 2011). No geral, sabe-se que eles têm duas maneiras de lidar com os extremos ambientais; uma maneira é entrar em um estado dormente, quase ametabólico, que pode ser a criptobiose ou a diapausa/encistamento; e a outra maneira, provavelmente exigindo uma alta taxa metabólica, envolve, por exemplo, osmorregulação e reparos no DNA, enquanto permanece ativo (Møbjerg et al., 2011). Essa capacidade de resistência extrema os tornou alvo de pesquisas de interesse médico, bioquímico, biotecnológico e até mesmo espacial, que visam compreender os mecanismos envolvidos e suas possíveis aplicações (Zhu & Sotne, 2022, Goldstein, 2022, Kasianchuk, 2023).

Atualmente são conhecidas cerca de 1400 espécies de tardígrados no mundo, descritas em duas classes válidas, Heterotardigrada Marcus, 1927 e Eutardigrada Marcus, 1927 (Degma & Guidetti, 2024). Os eutardígrados são divididos em duas ordens: Apochela Schuster, Nelson, Grigarick & Christenberry, 1980, predominantemente limnoterrestres, e Parachela Schuster, Nelson, Grigarick & Christenberry, 1980, limnoterrestres e dulcícolas. Eles são caracterizados por possuir gonópore e ânus unidos formando uma cloaca, Túbulos de Malpighi, e placóides na faringe consistindo de estruturas cuticulares espessas. Os heterotardígrados também são divididos em duas ordens: Echiniscoidea Richters, 1926, limnoterrestres e marinhos, e Arthrotardigrada Marcus, 1927, exclusivamente marinhos. Caracterizam-se por possuir o gonópore separado do ânus, ausência de Túbulos de Malpighi,

e placóides consistindo de estruturas cuticulares delicadas em forma de barra. Além disso, os apêndices sensoriais, como papilas e cirros, são comuns na região cefálica, no tronco e nos lobópodes dos heterotardígrados (Ramazzotti & Maucci, 1983).

II. O “estado da arte”: tardígrados limnoterrestres na América do Sul

Apesar da taxonomia de Tardigrada ter se iniciado no século XVIII com a descoberta desses organismos, a pesquisa com tardígrados foi dominada quase desde o início por dois tópicos: (1) a sua resistência (mais especificamente a criptobiose) e (2) as suas possíveis relações evolutivas com outros animais (Greven, 2018). De fato, esse grupo pode ser a chave para resolver algumas das relações filogenéticas entre os táxons de Ecdysozoa (Garey et al., 1996; Giribet et al., 1996), além de apresentar potencial econômico em torno da criptobiose e suas aplicações em biomedicina e biotecnologia (Guil & Cabrero-Sañudo, 2007). Contudo, os estudos taxonômicos, tão essenciais para estabelecer as bases necessárias para qualquer pesquisa, ainda são negligenciados.

Isso se acentua considerando questões históricas e geográficas. Na região Paleártica as descrições de espécies começaram meio século antes de qualquer outra região. Foi só a partir da década de 1940 que o número de espécies descritas aumentou consideravelmente em todas as regiões biogeográficas. Porém, em muitas regiões, como a Neotropical, o processo de descrição de espécies ocorre em passos abruptos, em vez de apresentar um aumento gradual e constante (Guil & Cabrero-Sañudo, 2007, Kaczmarek et al., 2015, Ugarte et al., 2023, Ugarte & Garraffoni, 2024). Além disso, o número de especialistas na região Paleártica é muito maior quando comparado com as demais, e os autores paleárticos são responsáveis por um grande número das descrições feitas não apenas em seu território, mas também nas regiões Afrotropical, Oriental, Antártica e Neotropical, ou seja, essas regiões carecem de especialistas nativos (Guil & Cabrero-Sañudo, 2007).

Mais especificamente na América do Sul, e se tratando de tardígrados limnoterrestres, embora existam países que apresentam um número significativo de estudos recentes, como a Argentina (por exemplo: Roszkowska et al., 2015, González-Reyes et al., 2016, Rocha et al., 2020, Rocha et al., 2023, Rocha et al., 2024) e a Colômbia (por exemplo, Lisi et al., 2014, Melo et al., 2015, Londoño et al., 2017, Lisi et al., 2022, Venencia-Sayas et al., 2023), existem outros países com apenas algumas descrições antigas e muito sucintas, como é o caso do Brasil, onde o estudo de tardígrados limnoterrestres se concentrou nas décadas de 1930 a 1950 (Rahm, 1932, Marcus 1936, 1937, de Barros 1938, 1939a, 1939b, 1942a, 1942b, 1943,

du Bois-Reymond Marcus 1944, 1952), e que começou a mudar de cenário apenas recentemente (da Rocha et al., 2016, de Barros, 2020, Guidetti et al., 2021, Ugarte et al., 2023, Ugarte & Garraffoni, 2024, Capítulo 1).

É comum que as descrições de espécies de tardígrados realizadas até o início do século XX sejam breves e careçam de informações que atualmente são importantes para a taxonomia do grupo (Pilato, 2013). Isso porque seu tamanho tão diminuto e sua fragilidade fazem necessário um manuseio muito cuidadoso e instrumentos laboratoriais específicos, o que torna o seu estudo difícil, principalmente em uma época de instrumentos ópticos limitados quando comparados aos atuais. Com isso, por muito tempo alguns caracteres morfológicos foram negligenciados; os caracteres métricos muitas vezes eram indicados subjetivamente (“pequeno”, “grande”, “longo”, “curto”); os desenhos das descrições geralmente eram genéricos ou feitos com as estruturas orientadas em uma posição inadequada (Pilato, 2013). Além disso, o material tipo de muitas espécies se perdeu ou nunca existiu, porque alguns autores não montaram lâminas permanentes, o que dificulta comparações com materiais atuais (Garraffoni et al., 2024).

Além dessas dificuldades técnicas recorrentes ao estudo de animais microscópicos, deve-se considerar também um viés epistemológico. Na primeira metade do século XX, os microbiologistas formularam a hipótese de que "tudo está em todo lugar, mas o ambiente seleciona", com base em microrganismos que foram observados em diferentes regiões do globo (Baas Becking, 1934; Gąsiorek, 2023). Com isso, passou a ser comum reportar espécies, mesmo que morfológicamente variáveis, em diferentes localidades ao redor do mundo. Logo isso se tornou um paradigma na biogeografia de microrganismos, que seria discutido até os dias atuais (Morek et al., 2021, Gąsiorek, 2023).

III. O caso *Milnesium*

A espécie *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840 é um exemplo clássico das questões citadas no tópico anterior. Trata-se de um eutardígrado da família Milnesiidae Ramazzotti, 1962, carnívoro e limnoterrestre (Ramazzotti & Maucci, 1983). Os milnesiídeos apresentam características muito distintas das encontradas nos demais taxa de Eutardigrada conhecidos: possuem papilas cefálicas e peribucais, não possuem placóides na faringe, e suas garras são formadas por dois ramos completamente separados (denominados ramos primários e secundários) (Schuster et al., 1980). Como resultado da morfologia única do grupo, por muito tempo variações sutis passaram despercebidas aos taxonomistas.

Seguindo a descrição da nominal *M. tardigradum*, duas outras espécies foram descritas com base em diferentes configurações de garras: *Milnesium alpigenum* Ehrenberg, 1853 e *Milnesium quadrifidum* Nederström, 1919. Entretanto, logo depois, essas espécies foram suprimidas por Marcus (1928), que reconsiderou o valor taxonômico do número de ganchos nos ramos secundários e concluiu que essas variações representavam apenas diferentes ‘raças geográficas’ de *M. tardigradum*. A opinião de que a configuração das garras era instável e, portanto, pouco útil como uma característica taxonômica em *Milnesium* foi apoiada por outros taxonomistas, e combinada com a visão de que os tardígrados eram cosmopolitas, gerou a uma subestimação severa da diversidade de espécies de *Milnesium* em todo o mundo (Michalczyk et al., 2012).

A partir da década de 1990 outras características passaram a ser observadas com mais atenção, como a textura da cutícula e as dimensões do aparelho bucal, levando a descrição de duas novas espécies, *Milnesium tetralamellatum* Binda & Pilato, 1991 e *Milnesium eury stomum* Maucci, 1991 (Morek et al., 2016a). Nos anos seguintes, o valor taxonômico da configuração das garras foi revisado e os taxonomistas chegaram ao consenso de que ela é um caráter estável. Diferenças no tamanho e forma (por exemplo, a presença ou ausência de pontos acessórios nos ramos primários e o número de ganchos nos ramos secundários) normalmente representam a variabilidade interespecífica, e portanto esses caracteres podem ser usados para diferenciação de espécies (Michalczyk et al., 2012). Recentemente, estudos demonstraram que a configuração das garras e outras características podem variar de acordo com o crescimento do tardígrado, ou seja, as espécies de *Milnesium* podem apresentar variabilidade ontogenética (Morek et al., 2016a; Morek et al., 2020).

A maior mudança no cenário da taxonomia de *Milnesium* foi provavelmente a revisão e redescrição da espécie nominal do gênero, feita por Michalczyk et al. (2012). Essa revisão, aliada a um olhar mais atento às variações morfológicas, morfométricas e genéticas, permitiu a descrição de novas espécies nos anos seguintes. Só na América do Sul *M. tardigradum* foi registrada em quase todos os países, sendo 47 registros na Argentina, 5 na Bolívia, 5 no Brasil, 23 no Chile, 6 na Colômbia, 1 no Equador, 2 no Paraguai, 3 no Peru, 8 no Uruguai e 1 na Venezuela (ver Kaczmarek et al., 2015, Ugarte et al., 2023, Ugarte & Garraffoni, 2024). Entretanto, considerando que todos esses registros são anteriores à redescrição de *M. tardigradum stricto sensu*, são considerados duvidosos e exigem um reexame seguindo os padrões taxonômicos atuais (Ugarte et al., 2023). Visto que atualmente não há evidências de que *M. tardigradum s. s.* ocorra na América do Sul, os espécimes registrados na região

provavelmente representam um número de diferentes espécies de *Milnesium* (Michalczyk et al., 2012).

Diante deste panorama, o presente projeto visou realizar a identificação e descrição de uma espécie de *Milnesium*, utilizando múltiplas abordagens, encontrada em Campinas (estado de São Paulo, Brasil), e posteriormente encontrada em outras localidades do Brasil, Argentina e Guiana Francesa.

| OBJETIVOS

Objetivo geral:

Descrever uma nova espécie de *Milnesium* encontrada em várias localidades da América do Sul, com o uso de diferentes técnicas de estudo morfológico e análise molecular, contribuindo assim para o conhecimento de tardígrados limnoterrestres ‘indígenas’ da região.

Objetivos específicos:

- 1) Descrever a espécie nova de *Milnesium* encontrada e registrar nas demais localidades da América do Sul em que foi encontrada.
- 2) Depositar o material tipo (lâminas permanentes e fotomicrografias) no Museu de Diversidade Biológica (MDBio) da Unicamp, ampliando assim a coleção de referência de Tardigrada do museu.
- 3) Depositar no banco de dados genético internacional *GenBank* as sequências parciais de genes que foram obtidas.

| MATERIAL E MÉTODOS

I. Coletas, triagem e armazenamento

O método de coleta consistiu em raspar com uma espátula alguns cm² de musgo e líquen de superfícies como rochas e troncos de árvores, e armazenar em sacos de papel devidamente identificados (Ramazzotti & Maucci, 1983). Em laboratório, o material coletado foi imerso em água destilada por cerca de 30 minutos, para que os tardígrados ficassem ativos, o que facilitaria sua visualização. Para a triagem, a água com o material foi colocada em placas de Petri e observada em estereomicroscópio. Com o auxílio de micropipetas, os tardígrados encontrados foram separados do substrato e designados a cada tipo de análise.

Os tardígrados designados para a análise morfológica foram anestesiados segundo o protocolo de Stec et al. (2015), que consiste em submetê-los a água destilada a 60°C por cerca de 40 minutos. Esse processo anestésico evita contrações musculares que podem ocorrer durante a fixação e que dificultam uma análise precisa das estruturas morfológicas. Depois de anestesiados, os tardígrados foram fixados em etanol a 70%, para preservação do material. Já os tardígrados designados para a análise molecular foram lavados três vezes em água destilada e armazenados diretamente em microtubos individuais com etanol absoluto.

Tratando-se das espécies do gênero *Milnesium*, é comum que ocorram algumas mudanças na morfologia ao longo do crescimento, principalmente mudanças no número de ganchos dos ramos secundários das garras e na cutícula que reveste o corpo (por exemplo: espessura das barras cuticulares nas pernas; configuração das pseudoplacas dorsais). Portanto, é necessário observar a morfologia em diferentes estágios: *hatchling* (logo após a eclosão do ovo), jovem e adulto. Para isso é preciso encontrar os ovos nas amostras e mantê-los em laboratório, em água destilada, à temperatura ambiente, até sua eclosão.

Locais de coleta amostrados:

- Campinas, Estado de São Paulo, Brasil (22°49'13.7"S 47°04'09.5"W);
- Santa Helena, Estado do Paraná, Brasil (24°58'43.3"S 54°12'09.5"W);
- Patos de Minas, Estado de Minas Gerais, Brasil (18°34'32.0"S 46°30'52.5"W);
- San Miguel de Tucumán, Província de Tucumán, Argentina (26°49'41"S 65°11'18"W).

II. Análise morfológica

Microscopia de luz (ML)

Alguns espécimes foram montados em lâminas permanentes, de acordo com as recomendações de Morek et al. (2016b). Os tardígrados foram montados em lâminas de microscopia com uma quantidade padrão (~50 µl) de meio de montagem Hoyer, e a lamínula colocada pressionando levemente e observando em estereomicroscópio até que o espécime esteja totalmente estendido mas não danificado. As lâminas foram deixadas secando em temperatura ambiente por pelo menos 24h e então foram observadas no microscópio Zeiss Axioskop 2 Plus equipado com contraste de interferência diferencial (DIC) e câmera AxioCam 105. Fotomicrografias e medidas foram tiradas utilizando o software Zeiss ZEN Blue Edition. no Laboratório de Evolução de Organismos Meiofaunais (LEOM) da Unicamp. Considerando que algumas estruturas cuticulares de importância taxonômica, como os pseudoporos, são melhor observadas em microscopia com contraste de fase, as lâminas permanentes também foram observadas e fotografadas no microscópio Axio Scope A1 Zeiss, também no LEOM.

Microscopia de fluorescência (UV)

Na microscopia de fluorescência, os comprimentos de onda da luz emitida são selecionados por filtros específicos para excitar e detectar moléculas fluorescentes, sejam elas coradas artificialmente ou que ocorrem naturalmente. Os fluorocromos endógenos são um componente natural da cutícula, garras e aparelho bucofaríngeo de tardígrados. Ao registrar a autofluorescência de tardígrados é possível documentar características taxonômicas que não são facilmente vistas com outras técnicas de microscopia (Perry et al., 2014). Para essa análise, as lâminas permanentes foram observadas com o microscópio Olympus BX60 equipado com filtros para detectar a autofluorescência UV, no Laboratório de Estudos Cromossômicos (LabEsC).

Medidas

As estruturas de importância taxonômica foram medidas de acordo com Pilato (1981) e Tumanov (2006). Para isso foram utilizadas as fotomicrografias tiradas no microscópio de luz com DIC e o *software* Zeiss ZEN Blue Edition. Todas as medidas são dadas em micrômetros (µm). Os espécimes e suas estruturas foram medidos apenas se sua orientação na lâmina estivesse adequada, de acordo com as recomendações de Bartels et al. (2011) e Stec et

al. (2016). Uma “amostra ideal” contempla um número mínimo de estruturas que precisam ser medidas para resultar em uma média e um intervalo que não são significativamente diferentes dos valores globais (da população). Isso permite uma interpretação mais confiável das dimensões dos caracteres taxonomicamente importantes (Stec et al., 2016). Esses caracteres são principalmente o comprimento corporal e os componentes do aparelho bucal e das garras, como: comprimento e largura do tubo bucal, nível do ponto de inserção dos estiletes no tubo, e comprimento de todos os ramos que compõem as garras.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os espécimes bem preservados (com o corpo devidamente estendido e sem estruturas danificadas) após terem sido anestesiados e fixados como descrito acima, foram submetidos a séries consecutivas de etanol (70%, 80%, 90% e 100%, este último por 3 vezes). Logo após o último banho de etanol foi realizada a desidratação por ponto crítico com CO₂, no Balzers CPD 030. Depois disso, os tardígrados foram montados em *stubs* de alumínio e passaram pela metalização, sendo cobertos com uma fina camada de ouro. Finalmente, a observação foi feita no microscópio eletrônico de varredura Jeol- JSM 5800LV, com a voltagem de 10 kV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) da Unicamp. As imagens obtidas em MEV possibilitaram um maior nível de detalhamento das estruturas externas com o aumento da magnificação.

III. Análise molecular

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

DNA genômico (18S e 28S) e mitocondrial (COI), de espécimes inteiros isolados nas triagens foram extraídos utilizando kits QIAGEN, seguindo as instruções do fabricante. Cada segmento extraído foi amplificado com reação em cadeia de polimerase (PCR). Para tal, foi utilizado um volume de reação de 25µL contendo 12,5µL de 2x Taq PCR Master Mix (Qiagen), 3µL de DNA, 8,7µL de água ultrapura e 0,4µL (4 pmol) de *primers* específicos. Cada recipiente foi incubado no termociclador com tempo de ciclo e temperatura de anelamento ótimos para cada par de *primers*. As sequências de *primers* e as condições de PCR utilizadas estão indicadas na Tabela 1. Para fins de controle de qualidade da amplificação e quantificação do produto final, foi utilizado eletroforese em gel de agarose a 1% contendo SYBR Green (Life Technologies). O sequenciamento foi feito pelo método de

Sanger no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) e no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, ambos da Unicamp.

Tabela 1. Sequências de primers e regimes de PCR utilizados para amplificação e sequenciamento.

Fragmento de DNA	Nome do primer	Direção do primer	Sequência do primer	Fonte do primer	Programa do PCR
18S	SSU01_F	Forward	AACCTGGTTGA TCCTGCCAGT	Sands et al. (2008)	Zeller (2010)
	SSU82_R	Reverse	TGATCCTTCTGC AGGTTCCACC		
	28SF0001	Forward	ACCCVCYNAAT TTAAGCATAT		
28S	28SR0990	Reverse	CCTTGGTCCGT GTTTCAAGAC	Mironov et al. (2012)	Mironov et al. (2012)
	COI_Mil.tar_Ff	Forward	TATTTTATTTTT GGTATTTGATGT GC		
COI	COI_Mil.tar_Rr	Reverse	CCTCCCCCTGC AGGATC	Morek et al. (2019a)	Morek et al. (2019a)

Alinhamento, distâncias genéticas, filogenia e haplótipos

Para determinar as posições filogenéticas foi utilizado o conjunto de dados apresentado por Morek et al. (2021) e as sequências obtidas neste estudo (Tabela 2). Em suma, as sequências foram alinhadas usando MAFFT v.7.215 (Katoh et al., 2002; Katoh e Toh, 2008), e os alinhamentos obtidos foram verificados e aparados no menor comprimento comum de cada marcador utilizando o *software* BioEdit (Hall 2011, disponível em: <https://bioedit.software.informer.com/7.2/>). Cada alinhamento foi utilizado para avaliar a distância genética entre os terminais com MEGA X (Kumar et al., 2018), incluindo todos os terminais, no modelo de Kimura com dois parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). Além disso, os quatro alinhamentos foram concatenados no SequenceMatrix (Vaidya et al., 2011). Uma análise de Inferência Bayesiana foi realizada no BEAST 1.10.4 e a árvore de consenso foi construída usando TREEANNOTATOR (Drummond et al., 2012). Por fim, para visualizar as possíveis relações intraespecíficas entre os espécimes, haplótipos de COI foram gerados utilizando o *software* o DNASP versão 5.10.01 (Librado & Rozas 2009), e uma rede foi calculada usando o programa PopART 44 com o método de inferência Integer Neighbor-Joining. A rede bruta produzida pelo PopART foi redesenhada usando o software Adobe Photoshop CS6.

IV. Depósito de material

O material utilizado foi depositado no Museu de Diversidade Biológica (MDBio) da Unicamp, sob os números de tombo: ZUEC TARD 1-28 (lâminas permanentes), ZUEC TARD 29-32 (*stubs*) e ZUEC PIC 863-879 (fotomicrografias). As sequências de genes obtidas estão disponíveis no banco de dados *GenBank* (ver números de acesso na Tabela 2).

Tabela 2. Material utilizado neste estudo. Números representam a quantidade de espécimes analisados em cada uma das técnicas utilizadas no presente estudo. LM - Microscopia de luz (morfologia e medidas), MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura, DNA - extração e sequenciamento de DNA (molecular). * Sequências de DNA ainda não depositadas no *GenBank*.

Amostra/Localidade	Substrato da amostra	Espécimes analisados			Números de acesso no <i>GenBank</i>
		ML	MEV	DNA	
Campinas, SP, Brasil (22°49'13.5"S 47°04'09.1"W)	Musgos em troncos de árvores	48	27	3	18S rRNA H1: PP062933 18S rRNA H2: PP062934 28S rRNA: PP062935 28S rRNA: PP062936 COI H1: OR887201 COI H2: OR887202 COI H3: OR887203
Santa Helena, PR, Brasil (24°58'43.3"S 54°12'09.5"W)	Musgos em troncos de árvores	4	5	3	*
Patos de Minas, MG, Brasil (18°34'32.0"S 46°30'52.5"W)	Musgos em troncos de árvores	26	17	2	*
San Miguel de Tucuman, Argentina (26°49'41"S 65°11'18"W)	Musgos e líquens	15	8	2	*
Campina de América, Argentina (26°17'0.18"S 53°46'55.7"W)	Musgos e líquens	1	0	1	18S rRNA: MW538133 28S rRNA: MW538211 ITS-2: MW538051 COI: MW560666
Chaco, Argentina (26°54'11.2"S 58°42'12.3"W)	Líquens	1	0	3	18S rRNA: MW538134 28S rRNA: MW538212 ITS-2: MW538052 COI: MW560667

Sinnamary, Guiana Francesa (05°20'50.5"N 52°50'47.9"W)	Musgos	1	0	2	18S rRNA: MW538135 28S rRNA: MW538214 ITS-2: MW538053 COI: MW560668
Sinnamary, Guiana Francesa (05°20'58.1"N 52°51'15.7"W)	Musgos	1	0	3	18S rRNA: MW538136 28S rRNA: MW538215 ITS-2: MW538054 COI: MW560669
Pimpin, Guiana Francesa (05°18'55.08"N 54°11'0.0"W)	Musgos	2	0	2	18S rRNA: MW538137 28S rRNA: MW538216 ITS-2: MW538055 COI: MW560670

| RESULTADOS

Essa Dissertação contempla dois capítulos. A seguir, são apresentados, de forma resumida, os principais resultados obtidos ao longo do estudo, e que estão mais detalhados em cada um desses capítulos.

I. Capítulo 1 - Uma nova espécie de *Milnesium* para América do Sul

“Morphological and molecular evidence for a new species of the genus *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada: Apochela) from south America”

No que se refere aos espécimes encontrados nas coletas realizadas em Campinas (SP, Brasil) primeiramente foi feita a análise morfológica, que evidenciou que esses espécimes distinguem-se da espécie *M. tardigradum stricto sensu* e de todas as espécies já descritas para o gênero. Posteriormente foram medidas todas as estruturas de importância taxonômica dos espécimes em bom estado. Foi feita a extração e amplificação de DNA por reação de cadeia de polimerase (PCR), e o sequenciamento pelo método Sanger, dos genes COI, 18S e 28S de 2 espécimes. Utilizando as sequências obtidas e as sequências de outras espécies de *Milnesium* depositadas no *GenBank* foi feita uma análise filogenética, no intuito de resgatar as relações de parentesco entre as espécies do gênero. Assim como a análise morfológica, a análise molecular indicou que os espécimes encontrados em Campinas representam uma nova espécie.

Essa espécie caracteriza-se por: corpo transparente com o dorso amarelado/amarronzado; olhos presentes; cutícula lisa (sem poros ou granulações), porém com pseudoplasmas (regiões “geometricamente” delimitadas) no dorso; lamelas da abertura bucal de tamanho assimétrico, sendo duas menores (laterais) e quatro maiores (dorsais e ventrais); seis papilas peribucais, sendo a ventral menor que as demais; barras cuticulares presentes nas pernas, abaixo das garras; as garras dos ramos primários possuem pontos acessórios; e principalmente, as garras dos ramos secundários apresentam três ganchos (configuração [3-3]-[3-3]), sendo as esporas (3º gancho) de tamanhos visivelmente diferentes (as internas e posteriores são menores do que as externas e anteriores). Os espécimes mais jovens (*hatchlings*) são semelhantes aos adultos, porém não possuem olhos, as barras cuticulares nas pernas são mais sutis, e os ramos secundários das garras apresentam apenas

dois ganchos (configuração [2-2]-[2-2]; mudança positiva = aumento no número de ganchos ao longo do crescimento).

Em paralelo à análise desses espécimes, foi feita uma colaboração internacional com um dos especialistas no gênero em questão, Witold Morek, que dispunha de material coletado em outras localidades da América do Sul. No material disponibilizado por ele foi possível identificar a espécie nas seguintes localidades:

- Campina de América, Misiones, Argentina (26°17'00.2"S 53°46'55.7"W);
- Vedia, Chaco, Argentina (26°54'11.2"S 58°42'12.3"W);
- Sinamary, Guiana Francesa (5°20'50.5"N 52°50'47.9"W e 5°20'58.1"N 52°51'15.7"W);
- Pimpi, Guiana Francesa (5°18'55.1"N 54°11'00.0"W).

Esses resultados foram apresentados e discutidos em mais detalhes no artigo “Morphological and molecular evidence for a new species of the genus *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada: Apochela) from south America”, publicado na revista científica *Zoologischer Anzeiger*, volume 309, páginas 55-65, em março de 2024 (doi.org/10.1016/j.jcz.2024.01.004).

II. Capítulo 2 - A distribuição de *Milnesium iniquum* na América do Sul

“Será *Milnesium iniquum* Brotto-Guidetti, Morek & Garraffoni, 2024 a primeira espécie ‘indígena’ de tardígrado limnoterrestre amplilocada na região Neotropical?”

Nesta segunda etapa do projeto foi realizada a análise das demais populações de *Milnesium* encontradas nas localidades de Patos de Minas, Santa Helena e San Miguel de Tucuman. Para isso, também foi utilizada microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, medidas das estruturas de importância taxonômica e análise do gene mitocondrial COI.

Os espécimes das três localidades revelaram a mesma morfologia observada na espécie nova encontrada em Campinas, *Milnesium iniquum* Brotto-Guidetti, Morek & Garraffoni 2024, tanto no caso de adultos quanto de *hatchings*. Além disso, as medidas de estruturas de importância taxonômica também se mostraram compatíveis com as medidas características dessa espécie, com algumas pequenas variações populacionais.

Além da análise morfológica, foi realizada a extração, amplificação e sequenciamento do gene COI de espécimes das três localidades para definir as distâncias genéticas entre todas

as populações conhecidas desta espécie e demais espécies de *Milnesium* disponíveis no *GenBank*. Essa análise indicou uma distância inferior a 5% entre as três novas populações e as já sequenciadas da espécie *M. iniquum*. Utilizando as sequências de COI também foi possível gerar uma rede de haplótipos dos espécimes.

Com essas evidências foi possível identificar os espécimes de todas as localidades amostradas nesse estudo como *M. iniquum* e, portanto, ampliar a distribuição conhecida para tal espécie na América do Sul. Assim, *M. iniquum* passa a ser a espécie ‘indígena’ neotropical, descrita com base na taxonomia integrativa, que apresenta a mais ampla distribuição geográfica desta região.

| CAPÍTULO 1

Morphological and molecular evidence for a new species of the genus *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada: Apochela) from South America

Emiliana Brotto-Guidetti¹, Witold Morek^{2,3}, André R. S. Garraffoni^{1*}

¹ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas, 13083-862, Campinas, Brazil.

² Department of Invertebrate Evolution, Institute of Zoology and Biomedical Research, Faculty of Biology, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387, Kraków, Poland.

³ Tree of Life, Wellcome Sanger Institute, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, United Kingdom.

*Corresponding author.

E-mail address: arsg@unicamp.br (A.R.S. Garraffoni)

ABSTRACT

Tardigrades are aquatic microinvertebrates, that can be found from the poles to the tropical regions. However, knowledge about their diversity and distribution is still limited, especially regarding the Neotropical region. In addition, many species described in the past were considered cosmopolitan but new morphological, morphometric and especially molecular studies have demonstrated the existence of species complexes. The species *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840 is an example that highlights this issue. Many *M. tardigradum* records made in South America date from the time when this species was considered cosmopolitan and exhibiting large intraspecific variability. However, current revisions of the genus using modern techniques indicate that the *M. tardigradum sensu stricto* is most likely restricted to the Palaearctic region. In this contribution, we describe a new species, *Milnesium iniquum* sp. nov. from south-eastern Brazil, with additional records from Argentina and French Guiana, utilising integrative taxonomy framework. The new species is characterised by having smooth cuticle, presence of dorsal pseudoplates, adult claw configuration [3-3]-[3-3] and [2-2]-[2-2] in hatchlings (early positive CC change), with internal and anterior spurs larger than external and posterior spurs and by presence of short cuticular bars on legs IV.

Keywords: Atlantic forest; integrative taxonomy; Milnesiidae; Neotropical region; urban park.

1. Introduction

Tardigrades are microinvertebrates that have a bilateral body, usually cylindrical and convex dorsally, averaging 250–500 μm in length (Nelson et al., 2015). They are distributed worldwide and found in distinct mesobenthos habitats, from rainforests to arid and polar deserts, from mountain tops to deep oceans (Nelson et al., 2018). Although they are common in terrestrial environments, all tardigrades require at least a waterfilm around the body to be active (Nelson, 2002). Approximately 1500 tardigrades species are currently recognised (Degma and Guidetti, 2023), described in two valid classes: Heterotardigrada Marcus, 1927 and Eutardigrada Richters, 1926. Guil et al. (2019) proposed a new combination by erecting a new class Apotardigrada, to accommodate the order Apochela Schuster et al., 1980 (Eutardigrada) but the necessity of this shift was questioned by Morek et al. (2020) and Fleming and Arakawa (2021), resulting in rejection of the proposed class.

Despite their popularity among researchers, the diversity and distribution of tardigrades is still more poorly known than about many other invertebrate taxa (Guil and Cabrero-Sanudo, 2007) and there are still biogeographic regions, for example the Neotropics, with several areas that have never been inventoried and few native taxonomists dedicated to the study of this phylum (Guil and Cabrero-Sanudo, 2007; Kaczmarek et al., 2015). Specifically, in South America, while there are some countries presenting a significant number of recent studies and species descriptions, such as Argentina (e.g., Guidetti et al., 2013; Roszkowska et al., 2015; Gąsiorek et al., 2022; Rocha et al., 2022), there are other countries with only old and brief descriptions and without type material deposited in museums, such as Brazil (e.g., de Barros, 1938, 1939a, 1939b, 1942a, 1942b, 1943).

The taxonomy of tardigrades is challenging, as in many cases only a limited number of taxonomically informative morphological characteristics is available (Gąsiorek et al., 2018; Morek et al., 2019a). As a result species descriptions are sometimes based on subtle differences that might be challenging to identify. Moreover, many Tardigrada species descriptions were published decades ago, and they are succinct with schematic drawings or even with misinterpreted structures due to e.g. unsuitable positions of animals on permanent slides. In addition, the type material of many species has been lost or never existed because some authors did not mount permanent slides (Pilato, 2013; Garraffoni et al., 2019). Because of that, some animals collected in distinct geographical areas were attributed to similarly

looking species from other regions (mainly Europe), resulting in overestimated geographic distribution (Pilato, 2013). This type of problem can be elucidated with an integrative approach based on in-depth morphological and genetic analysis (Jørgensen et al., 2018).

An emblematic taxonomic case of the problem described above is the species *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840. For decades the genus *Milnesium* Doyère, 1840, has been considered monotypic because considerable morphological variability was incorrectly interpreted as intraspecific and as a result *Milnesium tardigradum* was reported from all continents and treated as cosmopolitan (Michalczyk et al., 2012). This conviction started to change at the end of the last century, when the new species were described: *M. brachyungue* Binda and Pilato, 1990; *M. eury stomum* Maucci, 1991 and *M. tetralamellatum* Pilato and Binda, 1991. In the following years multiple descriptions of new species within this genus were published (e.g. Tumanov, 2006). The milestone was a formal redescription of *M. tardigradum* (Michalczyk et al., 2012), which clearly showed limited morphological variability of this species and provided the DNA barcodes. More recently, using morphometric and molecular techniques, a more accurate analysis of intraspecific variability and delineation of *Milnesium tardigradum* (Morek et al., 2019a) was conducted.

Currently, nearly 50 *Milnesium* species are recognised (Degma and Guidetti, 2023), and *Milnesium tardigradum* distribution is limited to the Palearctic region (Michalczyk et al., 2012; Roszkowska et al., 2015; Morek et al., 2019a; Morek and Michalczyk, 2020; Maskin et al. 2021, but see Morek et al., 2021). Since there is currently no evidence that *M. tardigradum sensu stricto* occurs in South America, specimens recorded in the region probably represent a number of different representatives of the genus (Michalczyk et al., 2012; Kaczmarek et al., 2015; Roszkowska et al., 2015).

In order to explore the diversity of terrestrial tardigrades in Brazil and contribute to filling the gaps in our knowledge about their diversity and distribution, we sampled mosses, mainly in search of *Milnesium* species. We found a population that revealed to be a new species thanks to an integrative investigation using modern methodology: 1) light microscopy with differential interference contrast (DIC); 2) epifluorescence microscopy (UV); 3) scanning electron microscopy (SEM); 4) sequencing three gene fragments, namely small ribosomal subunit (18S rRNA), large ribosomal subunit (28S rRNA), and the mitochondrial Cytochrome Oxidase C subunit I (COI); 5) ontogenetic variability assessment. Furthermore, we examined the phylogenetic position of the new *Milnesium* species within its congeners. Thanks to the use of molecular data we identified that this species was already recorded from other South American countries as undescribed new species (Morek et al., 2021), which

allowed us to examine molecular intraspecific variability and distribution of the newly described species.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and specimens

The specimens of *Milnesium iniquum* sp. nov. were found in a moss sample collected from tree trunks by EBG and ARSG in May 2018, at Universidade Estadual de Campinas, Campinas City, State of São Paulo, Brazil. The sample was collected and examined for tardigrades using standard methods (Ramazzotti & Maucci, 1983). In short, moss cushions were collected from tree trunks using a metal spatula and stored in identified paper bags. In the laboratory the moss sample was placed in a beaker filled with distilled water. After approximately 30 minutes, the moss was shaken into the beaker, and the sediment was transferred to Petri dishes and analysed under a Zeiss Stemi 508 stereomicroscope.

A total of 74 individuals and one exuvium with eggs of the new species were extracted from the sample. Specimens were split into four groups: (i) imaging and morphometry in light microscopy, (ii) imaging in scanning electron microscopy, (iii) DNA extraction and sequencing, and (iv) analysis of developmental variability by hatching (Morek et al., 2016b), i.e. the exuvium was kept in distilled water at room temperature until the eggs hatch and then the hatched specimens were observed with light microscopy. For the exact numbers of specimens used in each analysis see Table 1.

To obtain clean and extended animals, all specimens destined for morphological analysis were subjected to thermal relaxation according to the protocol of Stec et al. (2015). In short, it consists of a treatment in a 60°C distilled water bath for at least 30 min, i.e., until animals are dead and fully straightened. Then, they were stored in 70% ethyl alcohol.

Additional specimens from five samples, originating from Argentina and French Guiana (see Table 1 for collection details), containing *M. iniquum* sp. nov. were examined to infer the genetic intraspecific variability of the new species. Due to the low number of specimens and their unfavourable orientation, the quantitative traits were not measured.

2.2. Microscopy and imaging

2.2.1. Light microscopy

Specimens for light microscopy were mounted on microscope slides in a standard quantity (~50 µl) of Fluoromount™ aqueous (F4680 Sigma-Aldrich) medium, and the

coverslip was pressed gently for a brief moment with a pin while observing the specimen under a stereomicroscope until it was straightened but not damaged, as suggested by Morek et al. (2016a). Slides were then left to dry for a few days at room temperature. Dried slides were examined under a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope equipped with differential interference contrast (DIC) and an AxioCam 105 colour camera. Microphotographs and measurements were taken using Zeiss ZEN Blue Edition software.

Permanent slides were also examined using an Olympus BX60 epifluorescence microscope equipped with a Nomarski DIC condenser and lenses and filters for detecting UV autofluorescence (excitation filter: 330–385 nm, barrier filter: 420 nm) (Perry et al., 2015).

2.2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

Tardigrades were processed according to the protocol by Mitchell and Miller (2008) with modifications. In short, after thermal relaxation and fixation in 70% ethanol, they were subjected to a distilled water/ethanol series (once with 80%, 90%, 95%, and twice with 100%) and then to CO₂ critical point drying (CPD). Finally, the tardigrades were arranged in stubs and sputter-coated with ultra-thin layer of gold. Specimens were examined under high vacuum in a JSM 5800LV scanning electron microscope (10 kV), and microphotographs were taken using SemAfore 5.21.

2.3. Morphometrics and morphological nomenclature

All measurements are given in micrometres [μm]. Individuals and their traits were measured only if their orientation was suitable, according to Bartels et al. (2011) and Stec et al. (2016) recommendations. Body length was measured from the mouth opening to the end of the body, excluding the hind legs. Claw and buccal tube measurements were made according to Tumanov (2006), and additional buccal tube widths and ratios were determined based on Michalczyk et al. (2012). The *pt* ratio is the ratio of the length of a given structure to the length of the buccal tube, expressed as a percentage (Pilato, 1981) and in the text is always given in *italics*. Morphometric data were handled using the ‘Apochela’ ver. 1.2 template available from the Tardigrada Register, www.tardigrada.net/register (Michalczyk and Kaczmarek, 2013). Configuration of the number of claw points on secondary branches (claw configuration; abbreviated throughout the text as “CC”) is given according to Michalczyk et al. (2012). Configuration of pseudoplates (abbreviated throughout the text as “CP”) is given according to Moreno-Talamantes et al. (2019) and Rocha et al. (2022), i.e., all rows of pseudoplates are named and assigned to a specific place on the dorsal cuticle and the

number of pseudoplates is counted; the row numbers are always in Roman numerals and the number of pseudoplates is always listed in Arabic numerals.

2.4. DNA extraction and sequencing

Genomic and mitochondrial DNA was extracted from three entire individual specimens of *Milnesium iniquum* sp. nov. using a QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. DNA samples were subjected to PCR amplification in a reaction volume of 25 μ L containing 12.5 μ L of 2x Taq PCR Master Mix (Qiagen), 3 μ L of DNA, 8.7 μ L of water, and 0.4 μ L (4 pmol) of specific primers. The primer sequences and PCR conditions for 18S rRNA, 28S rRNA and COI are indicated in Table 2. ITS-2 amplification attempts were not successful (Forward: GCATCGATGAAGAACGCAGC; Reverse: TCCTCCGCTTATTGATATGC). The amplification products were electrophoresed in 1% agarose gels containing SYBR Green (Life Technologies). The DNA fragments were sequenced using BigDye Terminator reactions in a 3500XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Partial DNA sequences the specimens of *Milnesium iniquum* sp. nov. were deposited in GenBank (Table 1).

2.5. DNA sequences, alignments and phylogenetic analysis

To determine the phylogenetic position of *Milnesium iniquum* sp. nov. we utilised the dataset presented by Morek et al. (2021) and added the sequences of the new Brazilian population (Table 1), following the same methodology as in the above mentioned analysis. In short, the four molecular makers were aligned using MAFFT v.7.215 (Katoh et al., 2002; Katoh and Toh, 2008) with the Q-INS-I strategy applied to 18S and 28S rRNA to consider the secondary structure of RNA, whereas for ITS-2 and COI, the default settings were used. The obtained alignments were checked manually in BioEdit and then trimmed to 1,159 (18S rRNA), 887 (28S rRNA), 841 (ITS-2) and 569 bp (COI). Next, the four obtained alignments were concatenated in SequenceMatrix (Vaidya et al., 2011).

The Bayesian Inference analysis was carried out in BEAST 1.10.4 (Drummond et al., 2012), using a homogenous GTR model of nucleotide replacement coupled with a gamma distribution with four discrete categories. As the tree priors we used a relaxed exponential clock model with Speciation: Birth-Death Process, which were selected according to the Bayes factors calculated in TRACER 1.6 (available from <https://beast.bio.ed.ac.uk>). The analyses ran for 100 million generations, sampling every 10,000 steps. The consensus tree was built using TREEANNOTATOR (distributed with BEAST). For the molecular clock

calibration we used the same assumptions as in Morek et al. (2021), e.g. (a) the divergence between Hetero- and Eutardigrada according to the estimates of Guidetti et al. (2017), and (b) the origin of *Milnesium* based on the estimated age of the only known fossil *Milnesium swolenskyi* Bertolani and Grimaldi, 2000, as the lower boundary.

3. Results

3.1 Taxonomic account of the new species

Phylum: Tardigrada Doyère, 1840

Class: Eutardigrada Richters, 1926

Order: Apochela Schuster et al., 1980

Family: Milnesiidae Ramazzotti, 1962

Genus: *Milnesium* Doyère, 1840

Species: *M. iniquum* sp. nov. Brotto-Guidetti, Morek and Garraffoni

Milnesium sp. nov. #55 in Morek et al. (2021)

urn:lsid:zoobank.org:pub:5690AC23-F25B-481D-AFE4-6FA7C5B107B8

3.2. Integrative description

3.2.1. Mature females (from the third instar onwards; morphometrics in Table 3)

Body yellowish, with brown tones concentrated in the posterior dorsal region of the body before fixation, and transparent afterwards (Fig. 1A). Eyes present in 60% of specimens. Cuticle smooth but with small, faint and scattered pseudopores. The dorsum is covered with pseudoplates (delineated geometric areas of cuticle) (Fig. 1B-D, Fig. 2A-B). Configuration of pseudoplates is CP: I:? II:? III:? IV:4 V:6 VI:2 VII:8 VIII: 6 IX:10 X:4.

The clearly identifiable pseudoplates are present in: row IV with two pairs of medial rectangular pseudoplates transversally elongated; row V with three pairs of medial rectangular pseudoplates transversally elongated; row VI with one pair of medial rectangular pseudoplates transversally elongated; row VII with three pairs of medial rectangular pseudoplates, transversally elongated, and lateral to that central complex, on each side, one trapezoidal pseudoplate, longitudinally elongated; row VIII with one pair of medial rectangular pseudoplates transversally elongated, and lateral to that pair, on each side, two separate pseudoplates, with the mid-lateral one about triangular/rounded, and the most lateral

one, bigger, more or less quadrangular/rounded; row IX has ten pseudoplates with a central aggregation of eight pseudoplates forming a complex pattern (see Fig. 1B-D; Fig. 2A-B), and two lateral single pseudoplates about quadrangular, aligned mid-posteriorly. Row X with one pair of medial rectangular/quadrangular pseudoplates and lateral to that pair, on each side, one quadrangular/rounded pseudoplate. Additionally, there is also one faint rectangular pseudoplate on the dorsal surface of each leg IV, longitudinally elongated.

Six peribuccal papillae (the ventral papilla is smaller than the remaining five) around the mouth opening. Mouth opening with six triangular peribuccal lamellae of unequal size. Specifically, the two lateral peribuccal lamellae are smaller than the two dorsal and the two ventral peribuccal lamellae i.e. 4+2 configuration. The two smaller ones are sharply terminated, whereas the four larger are more bluntly terminated (visible in SEM; Fig. 2D). The internal surface of the peribuccal lamellae is longitudinally striped (visible in DIC; Fig. 2C). Two cephalic papillae positioned laterally, slightly smaller than the peribuccal papillae. Buccal apparatus of the *Milnesium* type. The buccal tube is wide and long (average standard width/length ratio 49%) and cylindrical (anterior/posterior width ratio 94%) (Table 3). Pharyngeal bulb elongated, pear-shaped, without placoids or septulum.

Claws of the *Milnesium* type. Primary branches on all legs tipped with small but visible accessory points (Fig. 2 E-H). Secondary branches on all legs with rounded basal thickenings, sometimes barely visible. Secondary branches on all legs with three points, [3-3]-[3-3] CC. The internal and anterior spurs are larger and longer than the external and posterior spurs (Fig. 2E-H). Single, long and transverse cuticular bars under claws I–III present (Fig. 2E). Single faint and short cuticular bar present at the base of each leg IV (Fig. 2F).

3.2.2. Males

No males were found in the type population nor in the additional material.

3.2.3 Juveniles

Similar in all qualitative traits to mature females.

3.2.4. Hatchlings (first instar, morphometrics in Table 4)

Similar in all traits to mature females, but with eyes absent, fainter cuticular bars under the claws, and spurs on all secondary branches absent, i.e. [2-2]-[2-2] CC (Fig. 3).

3.2.5. Ontogenetic variability

Milnesium iniquum sp. nov. undergoes early positive developmental change on the claw configuration, the CC changes from [2-2]-[2-2] in hatchlings to [3-3]-[3-3] in juveniles and adults. Assessed based on observations of hatching and analysis of morphometry (Surmacz et al., 2019b).

3.2.6. Eggs

Oval, smooth and deposited in exuvia as in all other known *Milnesium* species, with up to four eggs in a single clutch.

3.2.7. DNA markers

The characteristics of the obtained markers of the *Milnesium iniquum* sp. nov. from the type locality are as follows:

- 18S rRNA: H1, 949 bp long (GenBank: PP062933) and H2, 740 bp (PP062934); the uncorrected p-distance between the haplotypes: 0.01%.
- 28S rRNA: H1, 770 bp long (GenBank: PP062935) and H2, 769 bp (GenBank: PP062936)
- COI: H1, 658 bp (GenBank: OR887201); H2, 558 bp (OR887202); and H3, 537 bp (OR887203); the uncorrected p-distances between the haplotypes: 0.1–2.4%.

3.2.8. Type locality

22°49'13.5"S 47°04'09.1"W; 606 m asl; Institute of Biology, Universidade Estadual de Campinas, Campinas City, State of São Paulo, Brazil; mosses on tree trunks.

3.2.9. Type repositories

Holotype. Adult female collected in May 2018, mounted on a glass slide, deposited at the Museu de Diversidade Biológica (MDBio), Instituto de Biology, Universidade Estadual de Campinas, Brazil, under accession number ZUEC TAR X. Paratypes. 32 paratype specimens collected in May 2018, mounted on glass slides, deposited at the Museu de Diversidade Biológica (MDBio), under accessions numbers ZUEC TAR X. 27 paratype specimens mounted on stubs for SEM study deposited at the Museu de Diversidade Biológica (MDBio), under accessions numbers ZUEC TAR X. 17 paratype specimens were examined alive on the microscope, but due to the fragility of their bodies, they were destroyed and are no longer available. Photos of these paratype specimens (International Code of Zoological

Nomenclature, 2017: Articles 73, Recommendation 73G, in Declaration 45) are available in Photo Collection of the Museu de Diversidade Biológica (MDBio), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brazil, under accession numbers ZUEC-PIC 863-879.

3.2.10. Etymology

The name of the new species refers to the unequal size of the spurs on the secondary branches of the claws, from Latin *iniquus* meaning uneven.

3.2.11. Adult and juvenile phenotypic differential diagnosis

Milnesium iniquum sp. nov. is similar to 22 already recognised species of *Milnesium* characterised by having [3-3]-[3-3] adult CC, smooth cuticle, six lamellae and six papillae around the mouth opening and with accessory points on primary branches. However, by having internal and anterior spurs larger and longer than the external and posterior spurs, *M. iniquum* sp. nov. differs from all these species, except for *M. alpigenum* Ehrenberg, 1853, *M. shilohae* Meyer, 2015 and *M. quiranae* Rocha, González-Reyes, Ostertag and Lisi, 2022. By the presence of short cuticular bars on legs IV *Milnesium iniquum* sp. nov. differs from all 22 species, except for *M. beatae* Roszkowska, Ostrowska and Kaczmarek, 2015 and *M. burgessi* Schlabach, Donaldson, Hobelman, Miller and Lowman, 2018. Moreover, the new species differs in further traits specifically from:

- *M. alpigenum* by the arrangement of cuticular pseudoplates (a well-defined complex set of pseudoplates in all *M. iniquum* sp. nov. specimens (Fig. 2A-B) vs. weakly outlined pseudoplates on the caudo-dorsal cuticle in some specimens in *M. alpigenum*), the presence of cuticular bars on legs IV (absent in *M. alpigenum*), by the relatively wider buccal tube (buccal tube standard width/length (BTSWL) ratio 43–53% in *M. iniquum* sp. nov. vs 21–38% in *M. alpigenum*) and relatively shorter anterior primary branches IV (32.0–45.7 in *M. iniquum* sp. nov. vs 50.9–63.2 in *M. alpigenum*).
- *M. beatae* by the relatively narrower buccal tube (BTSWL ratio 43–53% in *M. iniquum* sp. nov. vs 58–66% in *M. beatae*) and the shape of the buccal tube (cylindrical in *M. iniquum* sp. nov.; the posterior/anterior width ratio of buccal tube 83–101% vs funnel shaped; 69–76% in *M. beatae*).
- *M. burgessi* by the presence of pseudoplates (absent in *M. burgessi*), by the relatively narrower buccal tube (BTSWL ratio 43–53% in *M. iniquum* sp. nov. vs 52.9–68.5% in

M. burgessi), and relatively shorter posterior primary branches IV (35.8–49.3 in *M. iniquum* sp. nov. vs 66.6–96.2 in *M. burgessi*).

- *M. quiranae* by: the presence of pseudoplates and short cuticular bars on legs IV (both absent in *M. quiranae*), the [2-2]-[2-2] CC in hatchlings ([3-3]-[3-3] CC in all life stages in *M. quiranae*), by the relatively narrower buccal tube (BTSWL ratio 43–53% in *M. iniquum* sp. nov. vs 59–68% in *M. quiranae*), and relatively shorter posterior primary branches IV (35.8–49.3 in *M. iniquum* sp. nov. vs 60.1–69.7 in *M. quiranae*).
- *M. shilohae* by: the presence of pseudoplates and short cuticular bars on legs IV (both absent in *M. shilohae*); a more anterior insertion of the stylet supports (63.5–72.5 in the new species vs 75.5–77.5 in the *M. shilohae*), and relatively shorter posterior primary branches IV 35.8–49.3, mean 42.8, N=12 in *M. iniquum* sp. nov. vs 48.3–55.5, mean 51.1, N=9 in *M. shilohae*; $t=6.255$, $df=22$, $p<0.001$).

3.2.12. Hatchling phenotypic differential diagnosis

The only species characterised by [2-2]-[2-2] CC, smooth cuticle and six peribuccal lamellae, for which the pattern of CC change remains unknown, is *M. kogui* Londoño et al., 2015, which differs from hatchlings of *M. iniquum* sp. nov. by:

- the maximal length of the buccal tube (27.9 μm in *M. iniquum* sp. nov. vs 30.7 μm in *M. kogui*), by the relatively narrower buccal tube (BTSWL ratio 41–47% in *M. iniquum* sp. nov. vs 29–36% in *M. kogui*), and the posterior/anterior width ratio of buccal tube (94–100% in *M. iniquum* sp. nov. vs 82–92% in *M. kogui*).

3.2.13. Genetic differential diagnosis

The ranges of uncorrected p-distances between the new species and available sequences for other congeners are as follows:

- 18S rRNA: 0.5%–2.2% (1.7% on average), with the most similar being the unidentified species: *Milnesium* sp. 21 (MK484092, Morek and Michalczyk, 2020), *M. sp.* 40 (MK484091, Morek and Michalczyk, 2020), *M. sp.* 43 (MW538180, Morek et al., 2021), *M. sp.* 45 (MW538181, Morek et al., 2021), *M. sp.* 54 (MK484098, Morek and Michalczyk, 2020), *M. sp.* 56 (MW538160, Morek et al., 2021), *M. sp.* 63 (MW538186, Morek et al., 2021), and *M. sp.* 64 (MW538161, Morek et al., 2021), and the least similar being *Milnesium pseudotardigradum* (MK484088, Morek and Michalczyk, 2020).

- 28S rRNA: 4.4%–14% (12.6% on average), with the most similar being an unidentified species *Milnesium* sp. 54 (MK484004, Morek and Michalczyk, 2020), and the least similar being *Milnesium pentapapillatum* (MT582508, Morek et al., 2020).
- COI: 6.7%–32.3% (19.7% on average), with the most similar being an unidentified species *Milnesium* sp. 54 (MK492303, Morek and Michalczyk, 2020) and the least being *Milnesium variefidum* (KT951666, Morek et al., 2016a)..

3.3. Phylogenetic position of the new species

The population of the new species from Brazil was placed in the pantropical clade ‘E’ (Fig. 4) sensu Morek et al. (2021), which groups species originating from South and North America, Africa and South-East Asia as well. The two populations from Argentina AR.437 and AR.470 also represent *M. iniquum* sp. nov., as the distance in COI is very low, 1.1–1.3% and 0.9–1.1%, respectively. Similarly, the three populations from French Guiana also belong to *M. iniquum* sp. nov., because the distance in COI ranges between 3.0–3.7%, and the differences in ITS-2 between the Argentinian and the French Guiana populations are minor (1.4–2.8%), also clearly indicating presence of single species. Moreover, the general morphology of the previously barcoded populations from both countries fits perfectly well with the Brazilian population. We do not provide morphometric data for those populations because few specimens were available, which are in addition unfavourably oriented as they were found dead (alive specimens were destined for DNA barcoding).

The addition of the new sequences to the dataset slightly changed the phylogenetic relationships within the clade E and in the current analysis two deep subclades are present. Importantly, both of them include species from South America, Africa and Asia. The sister species of *M. iniquum* sp. nov. is an undescribed tropical species from Asia (Philippines, Vietnam and Indonesia), *M. sp. nov. #54* (in Morek et al. 2021), and both species are most closely related to yet another undescribed species from South Africa (*M. sp. nov. #56*).

3.4. Ecology

Milnesium iniquum sp. nov. inhabits mosses on tree trunks. The new species is broadly distributed in South America, dwelling in rural, urban and forest habitats. Three specimens were observed to have rotifer mastax in the gut and one specimen was found with *Macrobiotus*-type claws in the buccal tube.

4. Discussion

Morphological traits in Milnesium

The claw configuration has been considered a stable character of important taxonomic value (i.e., except for occasional developmental aberrations) in the *Milnesium* taxonomy in recent years (Michalczyk et al., 2012). The variability of qualitative traits often observed in claw morphology in *Milnesium* species concerns the presence or absence of accessory points on the primary branches and the number of points on the secondary branches (Morek et al., 2016a). More recently, several works have demonstrated that some *Milnesium* species may undergo ontogenetic CC change, i.e., the number of points on secondary branches may increase or decrease during ontogenesis (Morek et al., 2016b, 2019a, Surmacz et al., 2019a, Sugiura et al., 2020). However, the size of the spurs was not yet fully discussed and can be another useful feature for species delimitation and differentiation within *Milnesium* (but see Tumanov, 2006). Except for *M. shilohae*, *M. alpigenum* (according to the redescription; Morek et al., 2019b), *M. quiranae* and *M. iniquum* sp. nov., all other *Milnesium* species exhibit spurs of the same or very similar size on external and internal and on anterior and posterior branches (Morek et al., 2016b). As this variation is uniform among the specimens observed in the new species, it cannot be considered to represent claw aberrations (i.e., additional spur, branch deformation or claw deformation) because these aberrations usually occur only in a small fraction of individuals (Morek et al., 2016b, 2019a). Thus, it can be considered as a valid trait for species identification.

Schlabach et al. (2018) used for the first time the cuticular bars under claws IV as a taxonomic trait that helped to distinguish *M. burgessi* from other twelve species with smooth cuticle and [3-3]-[3-3] CC. Previously, cuticular bars under leg IV were only mentioned by Tibbs et al. (2016) in a comparative description of *M. beatae* from Kansas, USA. Although transverse cuticular bars under claws I-III are very common in *Milnesium* species, only these three species have been formally described with cuticular bars on legs IV thus far. It is probable that other *Milnesium* species possess cuticular bars at the base of legs IV but they are usually fainter than cuticular bars under claws I-III and can be more easily overlooked. Therefore, it is important to elucidate the taxonomic value of this trait in future descriptions.

Milnesium and remaining tardigrade records in Brazil

Currently there is only one valid *Milnesium* species reported from Brazil, *M. tardigradum* Doyère, 1840 (e.g. Marcus, 1936, 1939; de Barros, 1943; du Bois-Reymond

Marcus, 1944; Assunção, 1999; Rocha et al., 2016). These *M. tardigradum* records suffer from the historical taxonomic issues mentioned in this paper. Most of them are lacking detailed descriptions or figures available, making their verification impossible. The exception was de Barros (1943), who reported a record with schematic drawings of *M. tardigradum* found in distinct localities in São Paulo State. In figure 27, de Barros (1943) drew secondary claws with three branches, and the internal and anterior spurs were considerably larger and longer than the external and posterior ones. In addition, the figure 26 depicts claws of a small specimen (hatchling?) with no basal spurs, i.e. [2-2]-[2-2] CC. This is in line with claw morphology of *M. iniquum* sp. nov. and was not observed in *M. tardigradum* s.s. However, considering that the description does not mention the asymmetry in spur lengths, it may be a result of a different orientation of internal and external spurs, which happens very often in specimens mounted on slides. Unfortunately, the slides made by de Barros are not available and therefore a more detailed examination is impossible. Therefore, we state that *M. tardigradum* cannot be considered as reliably recorded from Brazil and the records from São Paulo State probably consider *M. iniquum* sp. nov.

It is interesting to highlight that, despite that Kaczmarek et al. (2015) included Brazil as one of the South American countries that can be considered intensively studied, many biases must be pointed out (Ugarte et al., 2023): a) high number of reports and descriptions of new species based on a limited set of morphological characters, b) specimen drawings (including those of the new species) without sufficient details and morphometric data, considered insufficient according to modern standards; c) absence of molecular information in almost all known Brazilian species; d) approximately 60% of species records in Brazil (35 of 61) can be assigned as dubious because all these species were originally described in Europe and are no longer considered to be cosmopolitan but belonging to species complexes (de Barros, 2020). However, this and a few other more recent studies (e.g. Guidetti et al., 2021) have begun to change this picture. The training of new researchers, the establishment of a cooperation network among Brazilian and international tardigradologists to exchange information, and the use of modern study techniques may point to new horizons to the modern tardigrade research in a country as biodiverse as Brazil.

Future directions

One statement that we can make with absolute certainty is that our knowledge of the biodiversity of the Brazilian Tardigrada is far from complete, because a limited sampling effort was done and a low number of sampled sites were investigated (see de Barros, 2020 for

a complete and updated review of the past and present taxonomy of Brazilian tardigrades). Furthermore, the poor knowledge of this group is also related with the enormous land area in Brazil and the wide variety of terrestrial habitats and phytophysiognomies (e.g. Amazon and Atlantic Rain Forests, Brazilian Savanna, Caatinga, wetlands), offering markedly different geological and climatic conditions and plant diversity that can support a great number of species.

Acknowledgements

We express our gratitude to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2014/23856-0; 2018/25213-0; 2018/10313-0), to the staff of the Laboratório Multiusuário de Genotipagem e Sequenciamento (CBMEG/IB) for DNA sequencing, Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME/IB) for SEM analysis, and Laboratório de Estudo Cromossômicos (LabEsC/IB) for PCM and UV analysis, all of them at the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). The study was also supported by the Polish National Science Centre via the Preludium grant (n°. 2019/35/N/NZ8/04487 to WM).

References

- Assunção, C. M. L., 1999. Tardigrada. In: Ismael, D.; Valenti, W. C. Matsumura-Tundisi, T. Biodiversidade do Estado do São Paulo: Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX – Invertebrados de Água Doce. São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. v. 4, p. 61-64.
- Bartels, P. J., Nelson, D. R., Exline, R. P., 2011. Allometry and the removal of body size effects in the morphometric analysis of tardigrades. J. Zool. Syst. Evol. Res. 49, 17-25. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00593.x>
- Bertolani, R., Grimaldi, D., 2000. A new eutardigrade (Tardigrada: Milnesiidae) in amber from the upper cretaceous (Turonian) of New Jersey. In Studies on fossils in amber, with particular reference to the cretaceous of New Jersey: 103– 110. Grimaldi, D. (Ed). Leiden, Netherlands: Backhuys Publishers.
- Binda, M. G., Pilato, G., 1990. Tardigradi di Terra del Fuoco e Magallanes. I. *Milnesium brachyungue*, nuova specie di Tardigrado Milnesiidae. Animalia 17: 105–110.

- De Barros, R., 1938. *Macrobiotus evelinae* nova espécie dos tardígrados. Bol. Biol. 3, 52–54.
- De Barros, R., 1939a. *Pseudechiniscus juanita* nova espécie de tardígrado. Bol. Biol. 4, 367–368.
- De Barros, R., 1939b. *Itaquascon umbellinae* gen. nov. spec. nov (Tardigrada, Macrobiotidae). Zool. Anz. 128, 106–109.
- De Barros, R., 1942a. Tardígrados do Estado de São Paulo, Brasil. I. Introdução. Gêneros *Echiniscus* e *Pseudoechiniscus*. Rev. Bras. Biol. 2, 257-259.
- De Barros, R., 1942b. Tardígrados do Estado de São Paulo, Brasil. II. Gênero *Macrobiotus*. Rev. Bras. Biol. 2, 373-386.
- De Barros, R., 1943. Tardígrados do Estado de São Paulo, Brasil. III. Gêneros *Hypsibius*, *Itaquascon* e *Milnesium*. Rev. Bras. Biol. 3, 1-10.
- De Barros, R. C., 2020. Tardigrades research in Brazil: an overview and updated checklist. Arq. Zool. 51, 1-11. <https://doi.org/10.11606/2176-7793/2020.51.01>
- Degma, P., Guidetti, R., 2023. Actual Checklist of Tardigrada Species, 42th ed; University of Modena and Reggio Emilia: Modena, Italy. https://doi.org/10.25431/11380_1178608 (accessed on 02 November 2023).
- Doyère, M., 1840. Mémoire sur les Tardigrades. Ann. Sci. Nat. 2, 14, 269-362.
- Drummond, A., Suchard, M. A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.*, 22, 1185–1192. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- du Bois-Reymond Marcus, E., 1944. Sobre tardígrados brasileiros. Com. Zool. Mus. Montevideo 1, 1–19.
- Ehrenberg, C. G., 1853. Diagnoses novarum formarum. Ber. Akad. Wiss. Berlin 8, 526–533.
- Fleming, J. F., Arakawa, K., 2021. Systematics of Tardigrada: A reanalysis of tardigrade taxonomy with specific reference to Guil et al. (2019). Zool. Scr. 50, 376-382. <https://doi.org/10.1111/zsc.12476>

- Garraffoni, A.R.S., Kieneke, A., Kolicka, M., Corgosinho, P.H.C., Prado J., Nihei, S.S., Freitas, A.V.L., 2019. ICZN Declaration 45: a remedy for the nomenclatural and typification dilemma regarding soft-bodied meiofaunal organisms?. *Mar. Biodiv.* 49, 2199–2207. <https://doi.org/10.1007/s12526-019-00983-7>
- Gąsiorek, P., Stec, D., Morek, W., Michalczyk, Ł., 2018. An integrative redescription of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840) the nominal taxon for Hypsibioidea (Tardigrada: Eutardigrada). *Zootaxa* 4415, 45-75. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4415.1.2>
- Gąsiorek, P., Wilamowski, A., Vončina, K., Michalczyk, Ł., 2022. Neotropical jewels in the moss: biodiversity, distribution and evolution of the genus *Barbaria* (Heterotardigrada: Echiniscidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 195, 1037–1066. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlab087>
- Guidetti, E., Campos, A., Batistão, A. R., Silva, A. T. D., Bilatto, C. G., Salgado, K. A., Araújo, T.Q., Garraffoni, A. R. S., 2021. Gastrotrichs and tardigrades in a remnant of Atlantic Forest (Serra do Japi, SP, Brazil). *Biota Neotropica* 21 <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1165>
- 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). *J. Nat. Hist.* 47, 2409-2426. <https://doi.org/10.1080/00222933.2013.800610>
- Guidetti, R., McInnes, S. J., Cesari, M., Rebecchi, L., Rota-Stabelli, O., 2017. Evolutionary scenarios for the origin of an Antarctic tardigrade species based on molecular clock analyses and biogeographic data. *Contrib. Zool.* 86, 97-110.
- Guil, N., Cabrero-Sanudo, F. J., 2007. Analysis of the species description process for a little known invertebrate group: the limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada). *Biodiver. Conserv.* 16, 1063-1086. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9069-y>
- Guil, N., Jørgensen, A., Kristensen, R., 2019. An upgraded comprehensive multilocus phylogeny of the Tardigrada tree of life. *Zool. Scr.* 48, 120-137. <https://doi.org/10.1111/zsc.12321>

- Jørgensen, A., Kristensen, R.M., Møbjerg, N., 2018. Phylogeny and Integrative Taxonomy of Tardigrada. In: Schill, R. (eds) Water Bears: The Biology of Tardigrades. Zoological Monographs, vol 2. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_3
- Kaczmarek, Ł., Michalczyk, Ł., McInnes, S. J., 2015. Annotated zoogeography of non-marine Tardigrada. Part II: South America. Zootaxa 3923, 1-107. <https://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3923.1.1>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic. Acid. Resou. 30, 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Katoh, K., Toh, H., 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. Brief. Bioinformatics 9, 286–298. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn013>
- Londono, R., Daza, A., Caicedo, M., Quiroga, S., Kaczmarek, Ł., 2015. The genus *Milnesium* (Eutardigrada: Milnesiidae) in the Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia), with the description of *Milnesium kogui* sp. nov. Zootaxa 3955, 561-568. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3955.4.7>
- Marcus, E., 1927. Zur Anatomie und Ökologie mariner Tardigraden. Zool. Jb. Abt. Anat. 53, pp. 487-558
- Marcus, E., 1936. Tardigrada. Das Tierreich 66, 1-340.
- Marcus, E., 1939. IV. Tardigrada. The Percy Sladen Trust Expedition to Lake Titicaca. Trans. Linn. Soc. Lond. 1, 45-49.
- Maskin, E. V., Grebenkin, P.V., Zheleznova, L. V., Tumanov, D.V., 2021. New data on tardigrades of the genus *Milnesium* (Tardigrada, Eutardigrada, Milnesiidae) from the Russian Far East, obtained using the method of molecular barcoding. Kurentsov's Ann. Mem. Meet. 32, 114-122. <https://doi.org/10.25221/kurentzov.32.11>
- Maucci W., 1991. Tre nuove specie di Eutardigradi della Groenlandia Meridionale. Boll. Mus. Civ. Stor. Nat. Verona. 15, 279-289.

Meyer, H. A., 2015. Water bears (Phylum Tardigrada) of Oceania, with the description of a new species of *Milnesium*. N. Z. J. Zool. 42, 173-186.

Michalczyk, Ł., Welnicz, W., Frohme, M., Kaczmarek, Ł., 2012. Redescriptions of three *Milnesium* Doyère, 1840 taxa (Tardigrada: Eutardigrada: Milnesiidae), including the nominal species for the genus. Zootaxa 3154, 1-20. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3154.1.1>

Michalczyk, Ł., Kaczmarek, Ł., 2013. The Tardigrada Register: a comprehensive online data repository for tardigrade taxonomy. J. Limnol. 72, 175-181. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s1.e22>

Mironov, S. V., Dabert, J., Dabert, M., 2012. A new feather mite species of the genus *Proctophyllodes* Robin, 1877 (Astigmata: Proctophyllodidae) from the Long-tailed Tit *Aegithalos caudatus* (Passeriformes: Aegithalidae): morphological description with DNA barcode data. Zootaxa 3253, 54-61. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3253.1.2>

Mitchell, C., Miller, W. R., 2008. A simple SEM (Scanning Electron Microscope) preparation protocol for tardigrades. J. Pa. Acad. Sci. 81, 86-90.

Morek, W., Michalczyk, Ł., 2020. First extensive multilocus phylogeny of the genus *Milnesium* (Tardigrada) reveals no congruence between genetic markers and morphological traits. Zool. J. Linn. Soc. 188, 681-693. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz040>

Morek, W., Gąsiorek, P., Stec, D., Blagden, B., Michalczyk, Ł., 2016a. Experimental taxonomy exposes ontogenetic variability and elucidates the taxonomic value of claw configuration in *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada: Eutardigrada: Apochela). Contrib. Zool. 85, 173-200. <https://doi.org/10.1163/18759866-08502003>

Morek, W., Stec, D., Gąsiorek, P., Schill, R. O., Kaczmarek, Ł., Michalczyk, Ł., 2016b. An experimental test of eutardigrade preparation methods for light microscopy. Zool. J. Linn. Soc. 178, 785-793. <https://doi.org/10.1111/zoj.12457>

Morek, W., Stec, D., Gąsiorek, P., Surmacz, B., Michalczyk, Ł., 2019a. *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840: The first integrative study of interpopulation variability in a tardigrade species. J. Zool. Syst. Evol. Res 57, 1-23. <https://doi.org/10.1111/jzs.12233>

- Morek, W., Suzuki, A. C., Schill, R. O., Georgiev, D., Yankova, M., Marley, N. J., Michalczyk, Ł., 2019b. Redescription of *Milnesium alpigenum* Ehrenberg, 1853 (Tardigrada: Apochela) and a description of *Milnesium inceptum* sp. nov., a tardigrade laboratory model. *Zootaxa* 4586, 35-64. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4586.1.2>
- Morek, W., Ciosek, J. A., Michalczyk, Ł., 2020. Description of *Milnesium pentapapillatum* sp. nov., with an amendment of the diagnosis of the order Apochela and abolition of the class Apotardigrada (Tardigrada). *Zool. Anz.* 288, 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2020.07.002>
- Morek, W., Surmacz, B., López-López, A., Michalczyk, Ł., 2021. ‘Everything is *not* everywhere’: time-calibrated phylogeography of the genus *Milnesium* (Tardigrada). *Mol. Ecol.* 30, 3590–3609. <https://doi.org/10.1111/mec.15951>
- 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* 4691, 501-524. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4691.5.5>
- Nelson, D. R., 2002. Current status of the Tardigrada: evolution and ecology. *Integr. Comp. Biol.* 42, 652-659. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.652>
- Nelson, D. R., Guidetti, R., Rebecchi, L., 2015. Phylum Tardigrada. In Thorp and Covich's freshwater invertebrates (pp. 347-380). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00017-6>
- Nelson, D. R., Bartels, P. J., Guil, N. (2018). Tardigrade Ecology. In: Schill, R. (eds) *Water Bears: The Biology of Tardigrades*. Zoological Monographs, vol 2. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_7
- Perry, E. S., Miller, W. R., Lindsay, S., 2015. Looking at tardigrades in a new light: using epifluorescence to interpret structure. *J. Microsc.* 257, 117-122. <https://doi.org/10.1111/jmi.12190>
- Pilato, G., 1981. Analisi di nuovi caratteri nello studio degli Eutardigradi. *Animalia*, 8, 51-57.

- Pilato, G., Binda, M. G. 1991. *Milnesium tetralamellatum*, New Species of Milnesiidae from Africa (Eutardigrada). Trop. Zool. 4, 103-106. <https://doi.org/10.1080/03946975.1991.10539480>
- Pilato, G., 2013. The past, the present and the future of eutardigrade taxonomy. J. Limnol., 72. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s1.e1>
- Ramazzotti, G., 1962. Il Phylum Tardigrada (Vol. 14). Ise Cnr.
- Ramazzotti, G., Maucchi, W., 1983. Il Phylum Tardigrada. Terza edizione riveduta e aggiornata. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 41, 1-1012.
- Richters F., 1926. Tardigrada. Handbuch der Zoologie, III: 58-61.
- Rocha, C., Júnior, E., Santos, E., 2016. Brazilian limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada): New occurrences and species checklist updates. Rev. Nord. Zool. 10, 21-31.
- Rocha, A. M., González-Reyes, A. X., Ostertag, B., Lisi, O. 2022., The genus *Milnesium* (Eutardigrada, Apochela, Milnesiidae) in Argentina: description of three new species and key to the species of South America. Eur. J. Taxon. 822, 1-54. <https://doi.org/10.5852/ejt.2022.822.1807>
- Roszkowska, M., Ostrowska, M., Kaczmarek, Ł., 2015. The genus *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada) in South America with descriptions of two new species from Argentina and discussion of the feeding behaviour in the family Milnesiidae. Zool. Stud. 54, 12. <https://doi.org/10.1186/s40555-014-0082-7>
- Sands, C. J., McInnes, S. J., Marley, N., Goodall-Copestake, W. P., Convey, P., Linse, K., 2008. Phylum Tardigrada: An individual approach. Cladistics 24, 861-871. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00219.x>
- Schlabach, S., Donaldson, E., Hobelman, K., Miller, W. R., Lowman, M. D., 2018. Tardigrades of the canopy: *Milnesium burgessi* nov. sp. (Eutardigrada: Apochela: Milnesiidae) a new species from Kansas, USA. Trans. Kan. Acad. 121, 39-48. <https://doi.org/10.1660/062.121.0204>
- Schuster, R. O., Nelson, D. R., Grigarick, A. A., Christenberry, D., 1980. Systematic criteria of the Eutardigrada. Trans. Am. Microsc. Soc. 99, 284-303. <https://doi.org/10.2307/3226004>

- Stec, D., Smolak, R., Kaczmarek, Ł., Michalczyk, Ł., 2015. An integrative description of *Macrobiotus paulinae* sp. nov. (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae: *hufelandi* group) from Kenya. *Zootaxa* 4052, 501-526. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4052.5.1>
- Stec, D., Gąsiorek, P., Morek, W., Kosztyła, P., Zawierucha, K., Michno, K., Michalczyk, Ł., 2016. Estimating optimal sample size for tardigrade morphometry. *Zool. J. Linn. Soc.* 178, 776-784. <https://doi.org/10.1111/zoj.12404>
- Sugiura, K., Minato, H., Matsumoto, M., Suzuki, A. C., 2020. *Milnesium* (Tardigrada: Apochela) in Japan: The first confirmed record of *Milnesium tardigradum* s.s. and description of *Milnesium pacificum* sp. nov. *Zool. Sci.* 37, 476-495. <https://doi.org/10.2108/zs190154>
- Surmacz, B., Morek, W., Michalczyk, Ł., 2019a. What if multiple claw configurations are present in a sample? A case study with the description of *Milnesium pseudotardigradum* sp. nov. (Tardigrada) with unique developmental variability. *Zool. Stud.* 58, <https://doi.org/10.6620/ZS.2019.58-32>
- Surmacz, B., Morek, W., Michalczyk, Ł., 2019b. What to do when ontogenetic tracking is unavailable: a morphometric method to classify instars in *Milnesium* (Tardigrada). *Zool. J. Linn. Soc.* 188, 797-808. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz099>
- Tibbs, L., Emanuels, A., Miller, W. R., 2016. Tardigrades of the canopy: Argentine species *Milnesium beatae* Roszkowska, Ostrowska and Kaczmarek, 2015 (Eutardigrada, Milnesidae) discovered in the trees of Kansas, USA. *Trans. Kan. Acad. Sci.* 119, 173-178. <https://doi.org/10.1660/062.119.0207>
- Tumanov, D. V., 2006. Five new species of the genus *Milnesium* (Tardigrada, Eutardigrada, Milnesiidae). *Zootaxa* 1122, 1-23. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1122.1.1>
- Ugarte, P.D.S., Suzuki, L.P., Cruvinel, L.G., Garraffoni, A.R.S. 2023. Georeferenced database and interactive online map of limnoterrestrial and freshwater Tardigrada from Central and South America. *Biota Neotrop.* 23, e20231498. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2023-1498>

Vaidya, G., Lohman, D. J., Meier, R. 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27, 171-180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>

Zeller, C., 2010. Untersuchung der Phylogenie von Tardigraden anhand der Genabschnitte 18S rDNA und Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 (COX I). MSc thesis, Technische Hochschule Wildau, 105 pp.

Figures and Tables

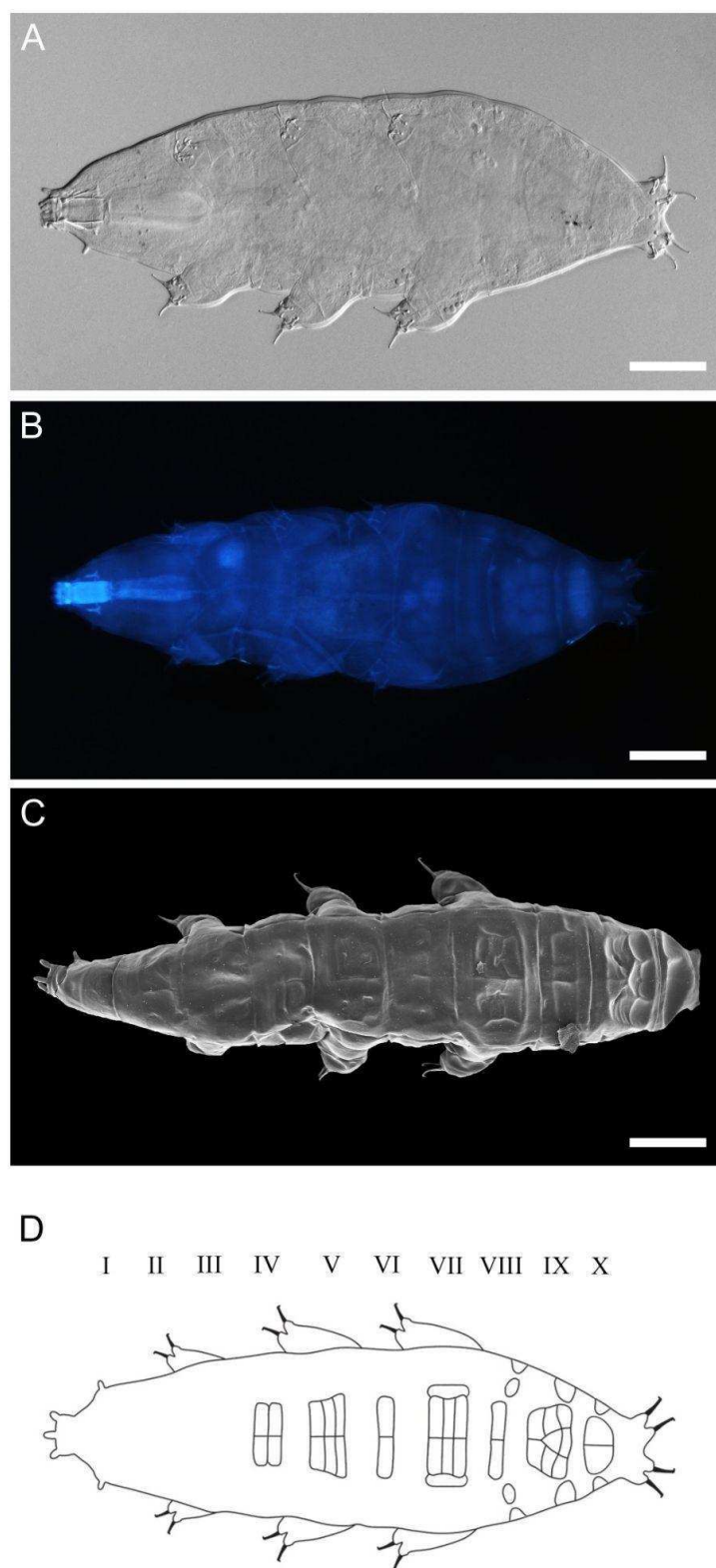


Fig. 1. General morphology of *Milnesium iniquum* sp. nov. A – habitus, DIC (holotype); B – habitus, UV (paratype); C – habitus, SEM (paratype); D – scheme of pseudoplate arrangement. Scale bars = 50µm.

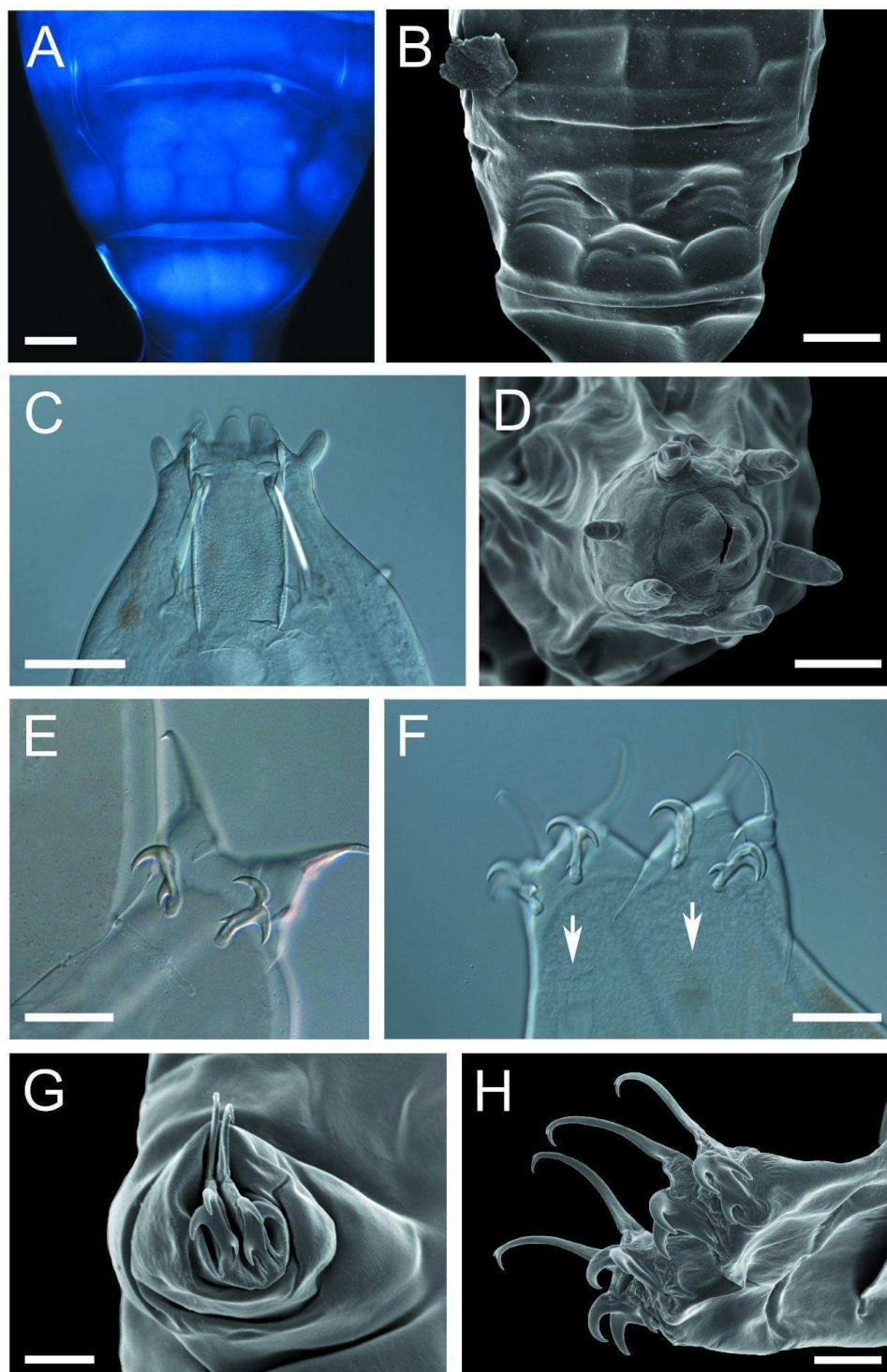


Fig. 2. Details of *Milnesium iniquum* sp. nov. adult/juvenile morphology. A – smooth dorsal cuticle, UV (paratype); B – smooth dorsal cuticle, SEM (paratype); C – buccal apparatus, DIC (paratype); D – mouth opening with six peribuccal lamellae of unequal size, 4+2 configuration, SEM (paratype); E – claws I-III with [3-3] configuration, DIC (paratype); F – claws IV with [3-3] configuration, DIC (paratype); G – claws I-III, SEM (paratype); H – claws IV, SEM (paratype). Scale bars A and B = 20µm; scale bars D, G and H = 10µm; scale bars E and F = 25µm.

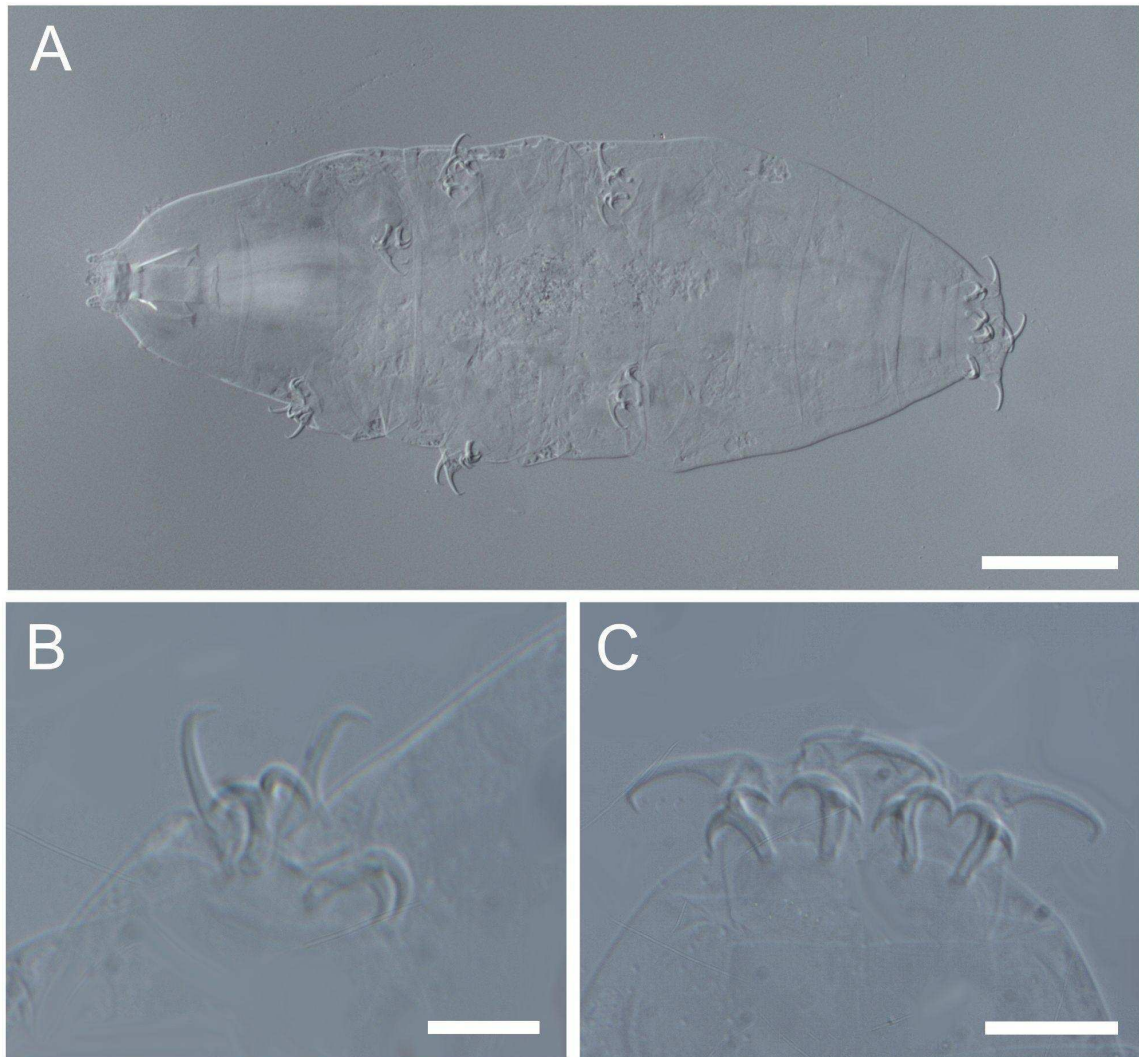


Fig. 3. General and detailed *Milnesium iniquum* sp. nov. hatchling morphology. A – habitus, DIC; B- claws I-III, DIC; C- claws IV, DIC. Scale bar A = 50µm; remaining scale bars = 10µm.

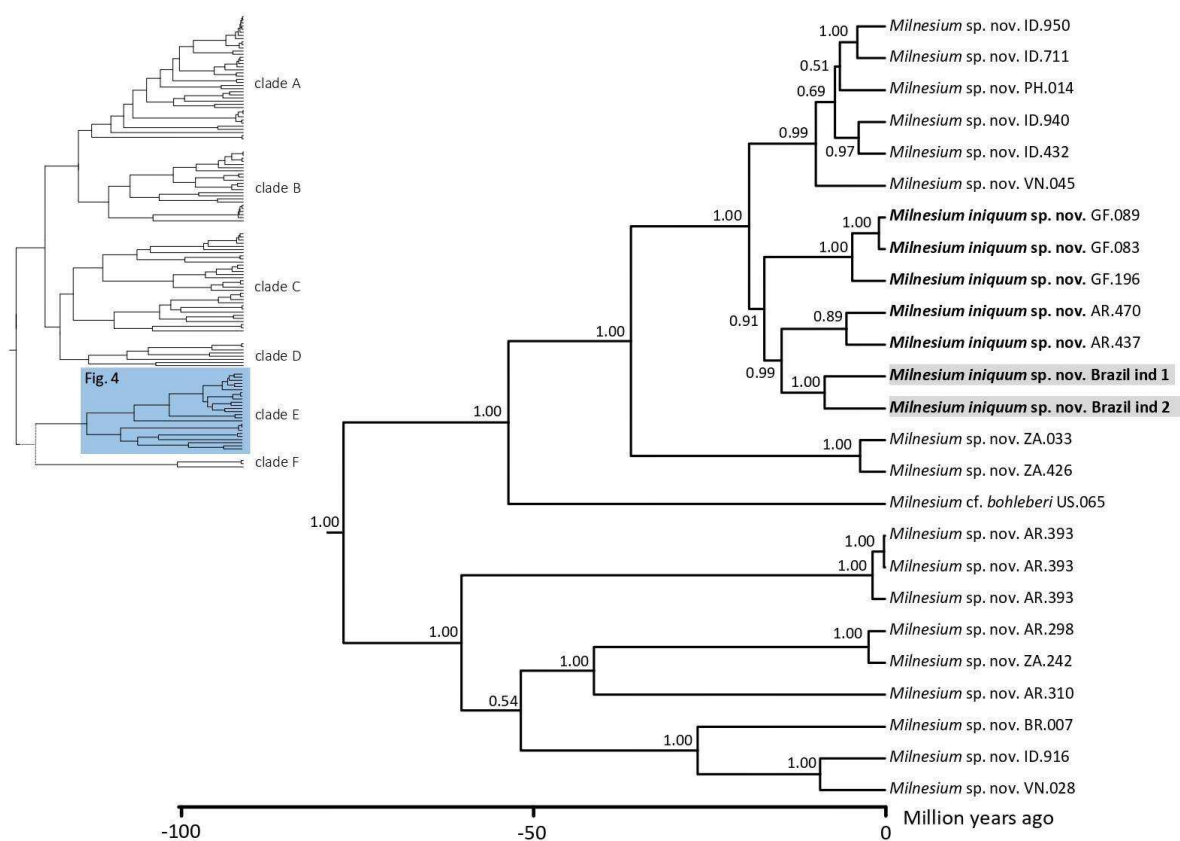


Fig. 4. Fragment of the *Milnesium* phylogenetic tree reconstructed using the time calibrated Bayesian Inference based on concatenated 18S rRNA +28S rRNA +ITS-2 + COI nucleotide sequences obtained with BEAST, showing the phylogenetic position of *Milnesium iniquum* sp. nov (bold) within clade E (sensu Morek et al. 2021). Values at nodes represent Posterior Probability (PP), the scale indicate time before present in millions of years.

Table 1. Collection data for populations analysed in this study. Analysis types: LCM – morphometry and general morphology in light microscopy; SEM – general morphology in scanning electron microscopy; DEV – developmental variability by hatching; DNA – DNA extraction and sequencing.

Sample code	Locality	Coordinates Altitude	Sample type	Specimens analysed				GenBank accession numbers
				LCM	SEM	DEV	DNA	
BR.000 [type locality]	Brazil, State of São Paulo, Universidade Estadual de Campinas	22°49'13.5"S 47°04'09.1"W 606 m asl	moss	48	27	3	3	18S rRNA H1: PP062933 18S rRNA H2: PP062934 28S rRNA: PP062935 28S rRNA: PP062936 COI H1: OR887201 COI H2: OR887202 COI H3: OR887203
AR.437	Argentina, vicinity of Campina de América	26°17'0.18"S 53°46'55.7"W 657 m asl	moss+ lichen	1	0	0	1	18S rRNA: MW538133 28S rRNA: MW538211 ITS-2: MW538051 COI: MW560666
AR.470	Argentina, Bermejo Department , Chaco	26°54'11.2"S 58°42'12.3"W 56 m asl	lichen	1	0	0	3	18S rRNA: MW538134 28S rRNA: MW538212 ITS-2: MW538052 COI: MW560667
GF.083	French Guiana, Route de l'Anse, Sinnamary commune	05°20'50.5"N 52°50'47.9"W 3 m asl	moss	1	0	0	2	18S rRNA: MW538135 28S rRNA: MW538214 ITS-2: MW538053 COI: MW560668
GF.089	French Guiana, Route de l'Anse, Sinnamary commune	05°20'58.1"N 52°51'15.7"W 1 m asl	moss	1	0	0	3	18S rRNA: MW538136 28S rRNA: MW538215 ITS-2: MW538054 COI: MW560669
GF.196	French Guiana, Pimpin	5°18'55.08"N 54°11'0.0"W 1 m asl	moss	2	0	0	2	18S rRNA: MW538137 28S rRNA: MW538216 ITS-2: MW538055 COI: MW560670

Table 2. Primer sequences and PCR regimes used for 18S rDNA, 28S rDNA and COI mtDNA amplification and sequencing.

DNA fragment	Primer name	Primer direction	Primer sequence (5'-3')	Primer source	PCR programme
18S rRNA	SSU01_F	Forward	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Sands et al. (2008)	Zeller (2010)
	SSU82_R	Reverse	TGATCCTTCTGCAGGTTTCACC		
28S rRNA	28SF0001	Forward	ACCCVCYNAATTTAAGCATAT	Mironov et al. (2012)	Mironov et al. (2012)
	28SR0990	Reverse	CCTTGGTCCGTGTTTCAAGAC		
COI	COI_Mil.tar_Ff	Forward	TATTTTATTTTGGTATTTGATGTGC	Morek et al. (2019a)	Morek et al. (2019a)
	COI_Mil.tar_Rr	Reverse	CCTCCCCCTGCAGGATC		

Table 3. Measurements and pt values of selected morphological structures of the adult females (holotype and 10 paratypes) from the type population of *Milnesium iniquum* nov. sp. All the available specimens were measured. (N = number of specimens measured; range = largest and smallest measured; SD = standard deviation).

CHARACTER	N	RANGE		MEAN		SD		Holotype	
		μm	pt	μm	pt	μm	pt	μm	pt
Body length	11	409 – 686	957 – 1464	493	1193	85	134	420	1228
Peribuccal papillae length	10	7.5 – 12.1	16.2 – 24.2	8.9	21.6	1.5	2.4	7.9	23.0
Lateral papillae length	10	5.9 – 9.6	12.8 – 19.2	7.0	17.0	1.2	1.9	6.5	19.1
Buccal tube									
Length	11	34.2 – 49.9	–	41.3	–	5.1	–	34.2	–
Stylet support insertion point	11	23.5 – 31.9	63.5 – 72.5	28.3	68.7	3.2	2.8	23.5	68.8
Anterior width	11	14.8 – 26.3	42.2 – 52.8	20.4	49.1	3.6	3.6	17.2	50.3
Standard width	11	14.9 – 26.3	43.1 – 52.6	20.4	49.1	3.6	3.2	17.3	50.6
Posterior width	11	14.1 – 23.6	40.8 – 48.6	19.0	45.8	3.1	3.0	16.6	48.5
Standard width/length ratio	11	43% – 53%	–	49%	–	3%	–	51%	–
Posterior/anterior width ratio	11	83% – 101%	–	94%	–	5%	–	97%	–
Claw 1 heights									
External primary branch	11	11.0 – 16.5	28.7 – 34.8	13.4	32.3	1.9	1.9	11.0	32.3
External base + secondary branch	11	7.5 – 14.4	21.6 – 28.9	10.9	26.3	1.9	2.4	9.5	27.6
External spur	11	2.1 – 3.7	5.1 – 8.2	2.7	6.6	0.5	0.9	2.8	8.2
External branches length ratio	11	67% – 90%	–	81%	–	7%	–	86%	–
Internal primary branch	11	11.0 – 17.0	27.5 – 34.5	13.2	32.0	1.9	2.1	11.5	33.7
Internal base + secondary branch	11	8.5 – 13.2	22.9 – 29.2	10.8	26.2	1.4	2.0	10.0	29.2
Internal spur	11	2.2 – 4.7	5.0 – 11.6	3.7	9.0	0.7	1.8	4.0	11.6
Internal branches length ratio	11	76% – 89%	–	82%	–	4%	–	86%	–
Claw 2 heights									
External primary branch	11	11.7 – 17.7	28.7 – 38.1	14.2	34.5	1.9	2.6	12.8	37.4
External base + secondary branch	11	8.0 – 14.3	20.1 – 29.9	11.0	26.5	2.0	3.0	10.0	29.1
External spur	11	2.1 – 3.5	4.5 – 8.4	2.7	6.7	0.4	1.1	2.9	8.4
External branches length ratio	11	68% – 83%	–	77%	–	6%	–	78%	–
Internal primary branch	11	9.9 – 17.7	28.7 – 39.4	14.1	34.0	2.3	3.2	11.9	34.8
Internal base + secondary branch	11	8.0 – 13.0	19.6 – 27.7	10.3	25.0	1.5	2.2	8.8	25.8
Internal spur	11	3.5 – 4.7	8.4 – 12.7	4.2	10.2	0.3	1.1	4.4	12.7
Internal branches length ratio	11	67% – 84%	–	74%	–	5%	–	74%	–
Claw 3 heights									
External primary branch	11	11.2 – 18.4	28.1 – 39.4	14.2	34.4	2.3	3.6	13.5	39.4
External base + secondary branch	11	9.2 – 13.2	22.0 – 29.2	11.0	26.7	1.3	1.9	10.0	29.2
External spur	11	2.1 – 4.0	5.4 – 8.0	2.6	6.4	0.6	1.0	2.7	7.8
External branches length ratio	11	72% – 94%	–	78%	–	6%	–	74%	–

Internal primary branch	11	12.0 – 17.1	27.7 – 39.0	14.2	34.5	1.7	3.0	12.8	37.5
Internal base + secondary branch	11	8.6 – 12.6	20.0 – 28.7	10.5	25.5	1.3	2.5	9.6	28.0
Internal spur	11	3.7 – 5.0	8.8 – 12.1	4.3	10.4	0.4	0.9	4.0	11.7
Internal branches length ratio	11	69% – 82%	–	74%	–	4%	–	75%	–
Claw 4 heights									
Anterior primary branch	11	12.9 – 21.4	32.0 – 45.7	16.9	41.0	2.6	4.0	15.6	45.6
Anterior base + secondary branch	11	10.6 – 16.5	25.5 – 35.2	12.8	30.9	2.1	3.0	10.6	30.9
Anterior spur	11	3.9 – 5.5	8.7 – 12.1	4.6	11.1	0.5	0.9	3.9	11.4
Anterior branches length ratio	11	68% – 82%	–	76%	–	5%	–	68%	–
Posterior primary branch	11	12.7 – 23.1	35.8 – 49.3	17.9	43.3	3.0	4.2	15.3	44.7
Posterior base + secondary branch	11	9.9 – 17.6	27.1 – 37.6	13.6	32.8	2.3	3.5	12.1	35.4
Posterior spur	11	1.9 – 3.4	4.0 – 9.7	2.5	6.1	0.5	1.5	2.2	6.4
Posterior branches length ratio	11	70% – 80%	–	76%	–	3%	–	79%	–

Table 4. Measurements and *pt* values of selected morphological structures of four hatchlings from the type population of *Milnesium iniquum* nov. sp. All the available specimens were measured. (N = number of specimens measured; range = largest and smallest measured; SD = standard deviation).

CHARACTER	N	RANGE		MEAN		SD	
		μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>
Body length	4	277 – 323	1037 – 1177	298	1101	24	62
Peribuccal papillae length	3	5.3 – 6.1	20.3 – 22.3	5.7	21.2	0.4	1.1
Lateral papillae length	4	4.2 – 6.5	15.5 – 23.4	4.9	18.0	1.1	3.7
Buccal tube							
Length	4	26.1 – 27.9	–	27.0	–	0.8	–
Stylet support insertion point	4	18.3 – 19.7	67.5 – 71.9	18.9	70.0	0.6	1.9
Anterior width	4	11.8 – 12.4	42.2 – 46.3	12.1	44.7	0.2	2.0
Standard width	4	11.5 – 12.3	41.3 – 46.9	12.0	44.6	0.3	2.5
Posterior width	4	11.0 – 12.0	39.5 – 45.2	11.6	43.1	0.4	2.5
Standard width/length ratio	4	41% – 47%	–	45%	–	3%	–
Posterior/anterior width ratio	4	94% – 100%	–	96%	–	3%	–
Claw 1 heights							
External primary branch	4	8.4 – 9.5	31.6 – 35.5	9.0	33.3	0.5	1.7
External base + secondary branch	4	7.3 – 8.0	26.1 – 30.8	7.7	28.6	0.3	2.0
External branches length ratio	4	78% – 95%	–	86%	–	8%	–
Internal primary branch	4	8.2 – 9.6	29.5 – 35.9	9.0	33.4	0.7	2.8
Internal base + secondary branch	4	6.8 – 8.3	24.4 – 31.9	7.6	28.2	0.6	3.2
Internal branches length ratio	4	77% – 96%	–	85%	–	8%	–
Claw 2 heights							
External primary branch	4	9.2 – 10.6	33.0 – 40.3	10.1	37.6	0.6	3.2
External base + secondary branch	4	7.1 – 7.6	25.4 – 28.6	7.3	27.2	0.3	1.4
External branches length ratio	4	67% – 77%	–	73%	–	4%	–
Internal primary branch	4	9.4 – 10.3	33.8 – 39.4	9.9	36.5	0.4	2.4
Internal base + secondary branch	4	6.7 – 7.7	24.2 – 27.9	7.3	27.0	0.4	1.9
Internal branches length ratio	4	71% – 79%	–	74%	–	4%	–
Claw 3 heights							
External primary branch	4	9.3 – 10.8	33.4 – 40.6	10.3	38.3	0.7	3.4
External base + secondary branch	4	6.7 – 8.0	24.9 – 29.3	7.3	26.9	0.6	2.0
External branches length ratio	4	64% – 76%	–	71%	–	6%	–
Internal primary branch	4	9.1 – 10.8	32.7 – 41.6	10.2	37.9	0.7	3.7

Internal base + secondary branch	4	7.7 – 7.9	28.4 – 29.3	7.8	28.8	0.1	0.5
Internal branches length ratio	4	71% – 87%	–	77%	–	7%	–
Claw 4 heights							
Anterior primary branch	4	8.4 – 11.3	30.1 – 43.3	10.3	38.4	1.3	5.8
Anterior base + secondary branch	4	7.6 – 8.1	27.9 – 31.1	7.9	29.2	0.2	1.5
Anterior branches length ratio	4	69% – 93%	–	77%	–	11%	–
Posterior primary branch	3	10.5 – 11.5	37.8 – 44.1	11.1	41.2	0.5	3.2
Posterior base + secondary branch	4	7.9 – 8.7	28.8 – 33.3	8.3	30.9	0.4	2.3
Posterior branches length ratio	3	69% – 77%	–	74%	–	4%	–

| CAPÍTULO 2

Será *Milnesium iniquum* Brotto-Guidetti, Morek & Garraffoni, 2024 a primeira espécie ‘indígena’ de tardígrado limnoterrestre amplilocada na região Neotropical?

Emiliana Brotto-Guidetti¹, Axell K. Minowa¹, André R. S. Garraffoni^{1*}

¹ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-862, Campinas, Brasil.

*Autor correspondente.

E-mail: arsg@unicamp.br (A.R.S. Garraffoni)

Palavras-chave: Tardigrada; América do Sul; taxonomia integrativa

Resumo

Tardígrados são microinvertebrados que podem ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestres úmidos e estão distribuídos praticamente no mundo todo. Por muito tempo, a maioria das espécies foram consideradas cosmopolitas, pois pensava-se que não apresentavam padrões de distribuição específicos. Com isso, muitas espécies originalmente descritas em determinada região, principalmente a Paleártica, foram registradas em localidades distintas do globo. Entretanto, análises atuais integrando múltiplas abordagens vêm demonstrando que essas espécies representam, na verdade, complexos de espécies. Esse é o caso da espécie *Milnesium tardigradum* Doyère 1840, a segunda espécie de tardígrado limnoterrestre com maior número de registros na região Neotropical. Atualmente sabe-se que a maior parte desses registros devem ser reavaliados, e que provavelmente mascaram uma diversidade maior de espécies ‘indígenas’. Um exemplo disso é a espécie *M. iniquum* Brotto-Guidetti, Morek & Garraffoni 2024, que foi descrita para o Brasil, e posteriormente encontrada em algumas localidades pontuais da Argentina e Guiana Francesa. Visando compreender melhor a diversidade e distribuição desses animais, esse estudo identificou *M. iniquum* em novas localidades da América do Sul, utilizando técnicas integradas, como microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e análise de distâncias genéticas com sequências de COI. Com isso, foi demonstrado que a espécie tem uma ampla distribuição na América do Sul.

Introdução

Um dos principais desafios da história natural, desde seus primórdios, é compreender como e por quê a riqueza de espécies varia no espaço, ou seja, determinar quais são as divisões naturais dos organismos vivos na Terra, visto que essas variações não ocorrem de forma aleatória, mas seguindo fatores ambientais, geográficos e históricos (Sclater, 1858; Willig et al. 2003). Nesse sentido, Wallace (1876) realizou a primeira análise biogeográfica a nível global e propôs a divisão da Terra em regiões zoogeográficas que são estudadas até os dias atuais em pesquisa de biogeografia, macroecologia e conservação (Holt et al., 2013; Fontaneto et al., 2012).

Normalmente os estudos biogeográficos focam em organismos de fácil observação, como os animais vertebrados, cujos esforços de amostragem são historicamente mais extensivos (Holt et al., 2013; Morek et al., 2021; Gasiorek, 2023). Táxons menos estudados são, portanto, mais suscetíveis a vieses de amostragem (Curini-Galletti et al., 2012) e sistemática inadequada (Aksenova et al. 2018), e por isso, muitas vezes os padrões de distribuição conhecidos acabam refletindo mais os esforços dos pesquisadores do que a distribuição real dos organismos (Fontaneto et al., 2012; Garraffoni et al., 2021).

Por terem um tamanho reduzido, e comumente apresentarem a habilidade de entrar em estágio de dormência, que possibilita a sobrevivência em ambientes com condições inóspitas, e de se reproduzir de forma assexuada, o que permite um crescimento populacional mais rápido, atribui-se aos microinvertebrados uma habilidade ilimitada de dispersão por longas distâncias e, portanto, de colonização bem-sucedida (Morek et al., 2021, Gasiorek 2023). Assim, pensava-se que não seguiam padrões biogeográficos específicos e foi proposta a hipótese de que “tudo está em todo lugar, mas o ambiente seleciona” (Baas Becking, 1934). Por muito tempo essa hipótese foi aceita, principalmente com base em poucas características morfológicas observadas em grupos de protozoários e diatomáceas (Fenchel et al., 1997).

Com o avanço dos equipamentos e técnicas de estudo morfológico, bem como o surgimento de ferramentas de análise molecular, e o aumento em áreas de amostragem, tem sido possível realizar identificações taxonômicas mais acuradas e reconstruir padrões de distribuição não aleatórios, contrariando o pensamento da época de que microinvertebrados não são limitados por suas habilidades de dispersão e, portanto, respondem sim a barreiras biogeográficas e ecológicas (Fontaneto, 2019; Garraffoni et al., 2021). Com isso, observou-se que muitos dos organismos inicialmente considerados cosmopolitas, ou seja, que ocupam todas ou quase todas as regiões zoogeográficas, na realidade representam complexos de

espécies ou espécies crípticas com distribuição local (Fontaneto et al., 2009; Fonseca et al., 2018).

No filo Tardigrada, que compreende microinvertebrados com alta capacidade de resistência, há muitas espécies que foram consideradas cosmopolitas no passado. Apenas se tratando de espécies limnoterrestres, revisões atuais (Kaczmarek et al., 2015, Ugarte et al., 2023, Ugarte & Garraffoni, 2024) mostram que dos 223 registros de tardígrados feitos na América do Sul, 110 representam espécies endêmicas, ou pelo menos ‘indígenas’ (isto é, que foram originalmente descritas na região e não apresentam registros duvidosos fora dela), enquanto o restante dos registros é composto por espécies que já haviam sido descritas em outras localidades, inclusive de regiões zoogeográficas bem distintas (Ugarte et al., 2023). Recentemente, alguns estudos vêm testando a capacidade de dispersão desses animais (Mogle et al, 2018, Fontaneto et al., 2019; Robertson et al., 2020, Vuori et al., 2022) e a hipótese de Baas Becking (Morek et al., 2021; Gasiorek et al., 2023, Ugarte & Garraffoni, 2024).

A identificação e delimitação precisa de espécies é de suma importância para se ter uma melhor compreensão da diversidade e dos padrões de distribuição destas. O uso integrado das técnicas morfológicas e moleculares indica que muitas espécies de tardígrados apresentam padrões de distribuição mais específicos. Isso porque utilizar mais de uma linha de evidência ajuda a elucidar a variabilidade inter- e intraespecífica, evitando inflação ou deflação taxonômica (Morek et al., 2016a, 2019, 2021; Surmacz et al., 2019; Momeni et al., 2023).

Um exemplo de táxon com considerável histórico de registros biogeográficos entre tardígrados limnoterrestres é o gênero *Milnesium* Doyère, que por décadas foi considerado monotípico e sua espécie-tipo, *Milnesium tardigradum* (Doyère, 1840) foi reportada em cerca de 15 países ao redor do globo, incluindo na América do Sul, onde é a segunda espécie com mais registros (ver Kaczmarek et al., 2015, Ugarte et al., 2023, Ugarte & Garraffoni, 2024). Esse cenário começou a mudar significativamente depois da redescritção da espécie-tipo (Michalczyk et al., 2012). Atualmente são reconhecidas cerca de 50 espécies e as análises filogenéticas mais recentes do gênero *Milnesium* sugerem que embora existam casos de dispersão de longa distância, eles são mais raros e, no geral, as espécies desse gênero são restritas a regiões zoogeográficas únicas, ou seja, esses tardígrados provavelmente têm habilidades de dispersão limitadas (Morek & Michalczyk, 2020; Gasiorek, 2023).

Assim, os registros de *M. tardigradum* feitos no passado para a América do Sul são atualmente considerados duvidosos e carecem de mais evidências (Kaczmarek et al., 2015). Portanto, os taxonomistas indicam a necessidade de concentrar os esforços em identificar e

compreender a diversidade de espécies ‘indígenas’ da região Neotropical (Ugarte & Garraffoni, 2024). Análises de Gasiorek (2023) sugerem que *Milnesium* é provavelmente um dos gêneros mais especiosos de Tardigrada, mas que cerca de 70% das espécies têm alcances geográficos limitados a uma única região zoogeográfica. Esse cenário reforça a importância do uso de técnicas de estudo integradas para se ter uma delimitação de espécies mais precisa, e do aumento no número de coletas para se ter uma amostragem significativa e evitar produzir padrões de distribuição enviesados.

Pensando nisso, esse estudo teve o objetivo de identificar de forma integrativa os espécimes de *Milnesium* que foram coletados em diferentes localidades da América do Sul, e que a partir de comparações morfológicas e moleculares entre as diferentes populações amostradas, observou-se que assemelham-se a uma das espécies ‘indígenas’ recentemente descrita na região Neotropical, *M. iniquum* Brotto-Guidetti, Morek & Garraffoni, 2024.

Material e métodos

Coletas e triagem

Amostras de musgo e líquen foram coletadas de troncos de árvores, seguindo recomendações padrão (Ramazzotti & Maucci, 1983), em três localidades da América do Sul: Santa Helena, PR e Patos de Minas, MG, no Brasil, e San Miguel de Tucuman, na Argentina. Os pontos de coleta utilizados no presente estudo e no Capítulo 1 foram representados em um mapa (Fig. 1) utilizando o *software* R (Tennekes, 2018; disponível em <https://www.r-project.org/>). O material foi armazenado em sacos de papel devidamente identificados. Em laboratório, as amostras foram deixadas em água destilada por cerca de 30 minutos para que os tardígrados fiquem ativos e mais fáceis de observar em estereomicroscópio. Com o auxílio de micropipetas, os tardígrados encontrados foram separados da amostra e destinados a cada tipo de análise. As localidades detalhadas e o material utilizado em cada análise são apresentadas na Tabela 1.

Análise morfológica

Para análise morfológica foi primeiramente feito o relaxamento segundo o protocolo de Morek et al. (2016b), seguido de fixação em etanol a 70%. Parte dos espécimes foram montados em lâminas de microscopia com meio de montagem Hoyer, observados em microscópio equipado com contraste de interferência diferencial (DIC), microscópio com contraste de fase e equipado com filtros para detectar a autofluorescência UV. Medidas de

estruturas de importância taxonômica foram obtidas de acordo com Pilato (1981), Tumanov (2006), Bartels et al. (2011) e Stec et al. (2016), utilizando o *software* Zeiss ZEN Blue Edition. Essas medidas são dadas em micrômetros e organizadas nas Tabelas 3-8 de acordo com o modelo ‘Apochela’ v 1.4 disponível em Tardigrada Register, www.tardigrada.net/register (Michalczyk & Kaczmarek, 2013). As exúvias com ovos que foram encontradas foram mantidas em água destilada à temperatura ambiente até a eclosão dos ovos, e então os tardígrados foram preparados para análise em microscopia. Outra parte dos espécimes passou por série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) seguida de desidratação por ponto crítico com CO₂, foram montados em *stubs* de alumínio e passaram por metalização com ouro, para serem observados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura.

Análise de distâncias genéticas e rede de haplótipos

Parte dos tardígrados foram fixados diretamente em etanol absoluto em *eppendorfs* individuais para análise molecular. Nessa análise foi extraído o gene COI utilizando *kits* QIAGEN, seguindo as instruções do fabricante, e amplificado por reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando Taq PCR Master Mix (QIAGEN), o DNA extraído, água ultrapura e *primers* específicos. Cada recipiente foi incubado no termociclador com tempo de ciclo e temperatura de anelamento ótimos para cada *primer*. As sequências de *primers* e as condições de PCR utilizadas estão indicadas na Tabela 2. Para controle de qualidade da amplificação e quantificação do produto final, foi utilizado eletroforese em gel de agarose. O produto final foi então sequenciado pelo método de Sanger. As sequências obtidas foram alinhadas usando MAFFT v.7.215 (Katoh et al., 2002; Katoh & Toh, 2008), e os alinhamentos foram verificados e aparados utilizando BioEdit (Hall 2011, disponível em: <https://bioedit.software.informer.com/7.2/>). Cada alinhamento foi então utilizado para avaliar a distância genética entre os terminais com MEGA X (Kumar et al., 2018), entre as sequências das demais espécies de *Milnesium* disponíveis no *GenBank*. Por fim, foram gerados haplótipos de COI utilizando o *software* DNASP versão 5.10.01 (Librado & Rozas 2009) e uma rede desses haplótipos foi calculada usando o programa PopART 4.4 com o método de inferência Integer Neighbor-Joining, para visualizar as possíveis relações intraespecíficas. A rede bruta produzida foi redesenhada usando o *software* Adobe Photoshop CS6 (Fig. 6).

Resultados

Análise morfológica

Um total de 82 espécimes pertencentes ao gênero *Milnesium* foram encontrados nas três amostras analisadas, sendo mais abundantes na amostra de Patos de Minas (46), seguido da amostra de San Miguel de Tucuman (25) e Santa Helena (11).

A análise morfológica indicou que todos os espécimes apresentaram o padrão morfológico observado em *M. iniquum*, isto é, corpo amarelado/amarronzado quando vivo e transparente depois de fixado (Fig.2); olhos presentes; cutícula lisa porém com pseudoplasmas dorsais (regiões “geometricamente” delimitadas; Fig.3); lamelas bucais de tamanho assimétrico, sendo duas menores (laterais) e quatro maiores (dorsais e ventrais) (Fig.4 A-B); seis papilas peribucais, sendo a ventral menor que as demais (Figs. 2 C-D, 4 A-B); barras cuticulares presentes nas pernas, abaixo das garras; garras dos ramos primários com pontos acessórios; garras dos ramos secundários com três ganchos (configuração [3-3][3-3]), sendo as esporas internas e posteriores menores do que as externas e anteriores (Figs. 2 E-F e 4 C-F). Os espécimes mais jovens (*hatchlings*) são semelhantes aos adultos, porém não possuem olhos, as barras cuticulares nas pernas são mais sutis, e os ramos secundários das garras apresentam apenas dois ganchos (configuração [2-2]-[2-2]), ou seja, sofrem mudança positiva (aumento no número de ganchos ao longo do crescimento).

Com relação às medidas das estruturas de importância taxonômica, os espécimes das três localidades também são compatíveis com a descrição original de *M. iniquum*, apresentando apenas algumas variações populacionais (Tabelas 3-8), sendo principalmente:

- Comprimento corporal: os espécimes adultos de Santa Helena apresentaram a maior média de comprimento corporal (619µm) e os de San Miguel de Tucuman, a menor (491µm); o maior *hatchling* foi encontrado também na população de Santa Helena (348µm).
- Proporção da largura posterior/anterior do tubo bucal: os espécimes adultos de Patos de Minas apresentam o maior índice, que vai de 94 a 109%, enquanto os *hatchlings* dessa mesma população apresentaram o menor índice, que vai de 84 a 95%.

Análise de distâncias genéticas

A análise de distâncias genéticas utilizando as sequências de COI indicou uma distância inferior a 5% entre as três localidades e as sequências de *M. iniquum*, e igual ou superior a 16% em relação às sequências de demais espécies de *Milnesium* disponíveis no

GenBank. As mais similares são *Milnesium reductum* Tumanov, 2006 e *Milnesium sp.* (ZA015; Morek et al., 2021), e as menos similares *Milnesium variefidum* Morek, Gąsiorek, Stec, Blagden & Michalczyk, 2016 e *Milnesium sp.* (ID947; Morek et al., 2021).

Para facilitar a visualização, os resultados foram organizados em uma tabela seguindo um gradiente de cores do verde (menores valores; maior similaridade) ao amarelo e vermelho, respectivamente (maiores valores; menor similaridade). Um destaque da tabela está representado na Figura 5.

Rede de haplótipos

A rede de haplótipos gerada (Fig. 6) indica 15 haplótipos compostos por um indivíduo cada, respectivos a cada amostra analisada, sendo oito do Brasil, quatro da Argentina e três da Guiana Francesa. Os haplótipos referentes às amostras da Guiana Francesa formam uma população geográfica coesa (*M. iniquum* GF.083, *M. iniquum* GF.089 e *M. iniquum* GF.196). Essa população está geneticamente mais próxima à formada pelos haplótipos de Patos de Minas, MG, Brasil (*M. iniquum* BR.002) do que das demais. Os demais haplótipos referentes às outras localidades do Brasil formam uma população respectiva a Campinas, SP (*M. iniquum* BR.000), e uma população respectiva a Santa Helena, PR (*M. iniquum* BR.001), que compartilham constituições genéticas mais semelhantes com haplótipos da Argentina. O exemplo mais extremo é representado pelo haplótipo *M. iniquum* AR.470, coletado na província de Chaco, Argentina, que compartilha uma constituição genética mais semelhante às populações do Brasil do que de outras localidades da Argentina. É difícil inferir se esses padrões observados nas populações geográficas de *M. iniquum* amostradas devem-se à dispersão natural de longa distância ou à dispersão mediada por outros fatores, como fatores humanos, por exemplo. A análise de uma amostra maior de localidades geográficas distantes pode revelar um nível mais elevado de diversidade críptica desses animais.

Discussão

Os trabalhos atuais envolvendo biogeografia de tardígrados têm sugerido padrões de distribuição variáveis, com casos que vão desde endemismo (espécies restritas a uma única região zoogeográfica) até a distribuições ubíquas e cosmopolitas (espécies que ocupam mais de uma ou quase todas as regiões zoogeográficas). A hipótese de que “tudo está em todo lugar”, portanto, tem sido substituída por abordagem de “estruturação regional” (Gasiorek, 2023). Até o momento, *M. iniquum* só foi registrada em uma única região zoogeográfica

(Neotropical), e portanto, pode-se considerar uma espécie endêmica (*sensu* Ugarte et al., 2023), ‘indígena’ (*sensu* Ugarte & Garraffoni, 2024), de distribuição local (*sensu* Gasiorek, 2023). Porém, o presente estudo demonstrou que ela pode ser encontrada em várias localidades da América do Sul, apresentando portanto uma distribuição ampla na região, o que é inédito para outras espécies ‘indígenas’ neotropicais.

A análise morfológica utilizando microscopia de luz e microscopia eletrônica possibilitou, já em um primeiro momento, a observação de características importantes para a identificação dos espécimes, que em todas as populações analisadas nesse estudo indicavam uma grande similaridade com *M. iniquum*. Visto que a espécie apresenta variações ontogenéticas, a presença de ovos em pelo menos parte das amostras foi crucial para uma análise morfológica mais completa (Brotto-Guidetti et al., 2024). Considerando, porém, que tem se tornado cada vez mais clara a importância de utilizar mais de uma linha de evidência nas identificações e descrições de espécies (Michalczyk et al., 2024), as medidas de estruturas de importância taxonômica e a análise de distâncias genéticas também revelaram informações úteis.

No geral, todas as populações analisadas apresentam medidas muito similares e consistentes com a descrição original de *M. iniquum*. Contudo, nem sempre é possível coletar e analisar uma amostra com quantidade suficiente de espécimes que permitiria uma interpretação confiável das dimensões de caracteres taxonomicamente importantes. Stec et al. (2016) define o tamanho de amostra ideal como um número mínimo de espécimes e estruturas que precisam ser medidas para resultar em uma média e um intervalo que não sejam significativamente diferentes dos valores globais (população) e sugere que, para uma estimativa média precisa, em geral é necessário no mínimo 20 medições. Além disso, as medidas devem ser obtidas em espécimes bem preservados e devidamente orientados, para evitar erros de interpretação (Bartels et al., 2011; Stec et al., 2016). A análise pode ser dificultada em populações menos abundantes, como ocorreu com a amostra de Santa Helena (SP, Brasil) em que foi possível medir as estruturas de apenas quatro espécimes. Reforçando a importância do uso de todas as técnicas de análise disponíveis.

Com relação a análise molecular, a necessidade de seu uso na taxonomia de Tardigrada é ainda debatida, embora seja um consenso que contribui significativamente para produção de trabalhos de maior confiabilidade (Michalczyk et al., 2024). As sequências de COI obtidas nesse estudo não só auxiliaram na identificação da espécie, como também levantaram algumas questões interessantes. É difícil inferir se os padrões de semelhanças genéticas e de distribuição geográfica observados na rede de haplótipos de *M. iniquum*

devem-se à dispersão natural de longa distância ou à dispersão mediada por outros fatores, como fatores humanos, por exemplo. A análise de uma amostra maior de localidades geográficas distantes pode revelar um nível mais elevado de diversidade críptica desses animais.

Na análise de distâncias genéticas, uma das sequências de maior similaridade com as sequências de *M. iniquum* é identificada como *Milnesium* sp. nov. US.071 (Morek et al., 2021), uma espécie da região Neártica. Em uma análise filogeográfica do gênero *Milnesium*, Morek et al. (2021) identifica 11 espécies (17% do conjunto de dados utilizado) coletadas exclusivamente em um reino zoogeográfico, diferente da maioria das espécies de um determinado clado, e que são denominadas como ‘espécies de inclusão’. *Milnesium* sp. nov. US.071 é uma dessas espécies. Na análise de Morek et al. (2021), *M. reductum* Tumanov 2006, uma espécie da região Paleártica, ocupa o mesmo grande clado que *Milnesium* sp. nov. US.071. Curiosamente, a análise de distâncias genéticas realizada no presente estudo também mostrou uma grande proximidade entre *M. reductum* e *M. iniquum*. Outra espécie considerada ‘de inclusão’, *Milnesium* sp. nov. BR.007 (Morek et al., 2021), originária do Brasil, aparece em Morek et al. (2021) no mesmo grande clado que *M. iniquum*. Neste estudo, *Milnesium* sp. nov. BR.007 tem uma das maiores distâncias genéticas em relação a *M. iniquum*, sugerindo que ela possivelmente representa uma nova espécie ‘indígena’ na América do Sul.

Assim, este é um exemplo de trabalho que reforça a ideia de que para se ter uma noção clara da diversidade e distribuição dos tardígrados, tanto em escala local quanto global, é necessária uma análise rigorosa, utilizando técnicas integradas e amostragens significativas. Isso é especialmente recomendável para táxons e regiões que historicamente são menos estudadas, como os tardígrados da região Neotropical. Apesar disso, observa-se uma mudança positiva de cenário, visto que o número de descrições de espécies novas e de taxonomistas trabalhando nessas regiões tem aumentado consideravelmente (Costello & Chaudhary, 2017).

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2014/23856–0; 2018/25213–0; 2018/ 10313–0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (PROTAX N.º 22/2020) pelos financiamentos, à equipe do Laboratório Multiusuário de Genotipagem e Sequenciamento (CBMEG/IB) pelos sequenciamentos de DNA, ao Laboratório de Microscopia Eletrônica

(LME/IB) pela análise de MEV, e ao Laboratório de Estudo Cromossômicos (LabEsC/IB) pelo uso do microscópio com filtros UV, todos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Referências

- Aksenova, O. V., Bolotov, I. N., Gofarov, M. Y., Kondakov, A. V., Vinarski, M. V., Beshpalaya, Y. V., ... & Vikhrev, I. V. (2018). Species richness, molecular taxonomy and biogeography of the radicine pond snails (Gastropoda: Lymnaeidae) in the Old World. *Sci. Rep.*, 8(1), 11199.. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29451-1>
- Baas Becking, L. G. M. (1934). *Geobiologie of Inleiding tot de Milieukunde*. Den Haag, Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon.
- Bartels, P. J., Nelson, D. R., Exline, R. P. (2011). Allometry and the removal of body size effects in the morphometric analysis of tardigrades. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 49, 17-25. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00593.x>
- Costello, M.J., Tsai, P., Wong, P.S., Cheung, A.K.L., Basher, Z. and Chaudhary, C., (2017). Marine biogeographic realms and species endemism. *Nat. Commun.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01121-2>
- Curini-Galletti, M., Artois, T., Delogu, V., De Smet, W. H., Fontaneto, D., Jondelius, U., ... & Todaro, M. A. (2012). Patterns of diversity in soft-bodied meiofauna: dispersal ability and body size matter. *PloS one*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033801>
- Fenchel, T., Esteban, G. F., & Finlay, B. J. (1997). Local versus global diversity of microorganisms: cryptic diversity of ciliated protozoa. *Oikos*, 220-225. <https://doi.org/10.2307/3546589>
- Fonseca, G., Fontaneto, D., & Di Domenico, M. (2018). Addressing biodiversity shortfalls in meiofauna. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 502, 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.05.007>
- Fontaneto, D., Barraclough, T. G., Chen, K., Ricci, C., & Herniou, E. A. (2008). Molecular evidence for broad-scale distributions in bdelloid rotifers: everything is not everywhere but most things are very widespread. *Mol. Ecol.*, 17(13), 3136-3146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03806.x>

- Fontaneto, D., Barbosa, A.M., Segers, H. and Pautasso, M. (2012). The ‘rotiferologist’ effect and other global correlates of species richness in monogonont rotifers. *Ecography* 35, 174–182. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2011.06850.x>
- Fontaneto, D. (2019). Long-distance passive dispersal in microscopic aquatic animals. *Mov. Ecol.*, 7, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40462-019-0155-7>
- Garraffoni, A., Sørensen, M. V., Worsaae, K., Di Domenico, M., Sales, L. P., Santos, J., & Lourenco, A. (2021). Geographical sampling bias on the assessment of endemism areas for marine meiobenthic fauna. *Cladistics*, 37(5), 571-585. <https://doi.org/10.1111/cla.12453>
- Gąsiorek, P. (2023). Catch me if you can, or how paradigms of tardigrade biogeography evolved from cosmopolitism to ‘localism’. *Zool. J. Linn. Soc.*, 202(2), zlad191. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad191>
- Holt, B. G., Lessard, J. P., Borregaard, M. K., Fritz, S. A., Araújo, M. B., Dimitrov, D., ... & Rahbek, C. (2013). An update of Wallace’s zoogeographic regions of the world. *Science*, 339(6115), 74-78. <https://doi.org/10.1126/science.1228282>
- Kaczmarek, Ł., Michalczyk, Ł., & McInnes, S. J. (2015). Annotated zoogeography of non-marine Tardigrada. Part II: South America. *Zootaxa*, 3923 (1), 001–107. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3923.1.1>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic. Acid. Resou.* 30, 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Katoh, K., Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief. Bioinformatics* 9, 286–298. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn013>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>

- Michalczyk, Ł., Welnicz, W., Frohme, M., Kaczmarek, Ł. (2012). Redescriptions of three *Milnesium* Doyère, 1840 taxa (Tardigrada: Eutardigrada: Milnesiidae), including the nominal species for the genus. *Zootaxa* 3154, 1-20. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3154.1.1>
- Michalczyk, Ł., Kaczmarek, Ł., (2013). The Tardigrada Register: a comprehensive online data repository for tardigrade taxonomy. *J. Limnol.* 72, 175–181. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s1.e22>.
- Michalczyk, Ł., Gross, V., & Arakawa, K. (2024). Progress in research on water bears presented at the 15th International Symposium on Tardigrada (Kraków, 22nd–26th of August 2022). *Zool. J. Linn. Soc.*, 200(1), 1-11. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad199>
- 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. <https://doi.org/10.7717/peerj.5035>
- Momeni, S., Gąsiorek, P., Loeffelholz, J., Chtarbanova, S., Nelson, D. R., Fletcher, R. A., ... & Pienaar, J. (2023). Green armoured tardigrades (Echiniscidae: *Viridiscus*), including a new species from the Southern Nearctic, exemplify problems with tardigrade variability research. *Sci. Rep.*, 13(1), 16329. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40609-4>
- Morek, W., Gąsiorek, P., Stec, D., Blagden, B., Michalczyk, Ł. (2016a). Experimental taxonomy exposes ontogenetic variability and elucidates the taxonomic value of claw configuration in *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada: Eutardigrada: Apochela). *Contrib. Zool.* 85, 173-200. <https://doi.org/10.1163/18759866-08502003>
- Morek, W., Stec, D., Gąsiorek, P., Schill, R. O., Kaczmarek, Ł., Michalczyk, Ł., (2016b). An experimental test of eutardigrade preparation methods for light microscopy. *Zool. J. Linn. Soc.* 178, 785-793. <https://doi.org/10.1111/zoj.12457>
- Morek, W., Stec, D., Gąsiorek, P., Surmacz, B., Michalczyk, Ł., (2019). *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840: The first integrative study of interpopulation variability in a tardigrade species. *J. Zool. Syst. Evol. Res* 57, 1-23. <https://doi.org/10.1111/jzs.12233>
- Morek, W., & Michalczyk, Ł. (2020). First extensive phylogeny of the genus *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada) reveals no congruence between genetic markers and morphological traits. *Zool. J. Linn. Soc.*, 188, 681–693. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz040>

- Morek, W., Surmacz, B., López-López, A., & Michalczyk, Ł. (2021). “Everything is not everywhere”: Time-calibrated phylogeography of the genus *Milnesium* (Tardigrada). *Mol. Ecol.*, 30(14), 3590-3609. <https://doi.org/10.1111/mec.15951>
- Ramazzotti, G., & Maucci, W. (1983). The phylum Tardigrada—3rd edition: English translation by CW Beasley. *Mem. Inst. Ital. Idrobiol. Dott. Marco de Marchi*, 41.
- Robertson, M. W., Russo, N. J., McInnes, S. J., Goffinet, B., & Jiménez, J. E. (2020). Potential dispersal of tardigrades by birds through endozoochory: evidence from Sub-Antarctic White-bellied Seedsnipe (*Attagis malouinus*). *Polar Biol.*, 43(7), 899-902. <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02680-9>
- Slater, P. L. (1858). On the general geographical distribution of the members of the class Aves. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2(7), 130-136.
- Stec, D., Gąsiorek, P., Morek, W., Koszyła, P., Zawierucha, K., Michno, K., Michalczyk, Ł., 2016. Estimating optimal sample size for tardigrade morphometry. *Zool. J. Linn. Soc.* 178, 776-784. <https://doi.org/10.1111/zoj.12404>
- Surmacz, B., Morek, W., & Michalczyk, Ł. (2019). What if multiple claw configurations are present in a sample? A case study with the description of *Milnesium pseudotardigradum* sp. nov.(Tardigrada) with unique developmental variability. *Zoological Studies*, 58, e32. <https://doi.org/doi:10.6620/ZS.2019.58-32>
- Vuori, T., Calhim, S., & Vecchi, M. (2022). A lift in snail's gut provides an efficient colonization route for tardigrades. *Ecology*, 103(7), e3702. <https://doi.org/10.1002/ecy.3702>
- Pilato, G., (1981). Analisi di nuovi caratteri nello studio degli Eutardigradi. *Animalia*, 8, 51-57.
- Tennekes, M. (2018). Thematic maps in R. *Journal of Statistical Software. J. Stat. Softw.*, 84:1–39. <https://doi.org/10.18637/jss.v084.i06>
- Tumanov, D. V., (2006). Five new species of the genus *Milnesium* (Tardigrada, Eutardigrada, Milnesiidae). *Zootaxa* 1122, 1-23. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1122.1.1>
- Ugarte, P. D. D. S., Suzuki, L. P., Cruvinel, L. G., & Garraffoni, A. R. S. (2023). Georeferenced database and interactive online map of limnoterrestrial and freshwater

Tardigrada from Central and South America. *Biota Neotrop.*, 23(3).
<https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2023-1498>

Ugarte, P. D. D. S., & Garraffoni, A. R. S. (2024). Removal of historical taxonomic bias and its impact on biogeographic analyses: a case study of Neotropical tardigrade fauna. *Zool. J. Linn. Soc.*, 201(3), zlae091. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlae091>

Wallace A. (1876). *Geographical Distribution of Animals*. London: McMillian & co.

Figuras e Tabelas

Tabela 1. Locais de coleta e material utilizado em cada análise. ML - Microscopia de luz (análise da morfologia e medidas), MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura (análise da morfologia), DNA - extração e sequenciamento de DNA (análise molecular).

Amostra/Localidade	Substrato da amostra	Espécimes analisados		
		ML	MEV	DNA
BR.000 Campinas, SP, Brasil (22°49'13.5"S 47°04'09.1"W)	Musgos em troncos de árvores	48	27	3
BR.001 Santa Helena, PR, Brasil (24°58'43.3"S 54°12'09.5"W)	Musgos em troncos de árvores	4	5	3
BR002. Patos de Minas, MG, Brasil (18°34'32.0"S 46°30'52.5"W)	Musgos em troncos de árvores	26	17	2
AR.000 San Miguel de Tucuman, Argentina (26°49'41"S 65°11'18"W)	Musgos e líquens	15	8	2

Tabela 2. Sequências de *primers* e regimes de PCR utilizados para amplificação e sequenciamento de DNA.

Fragmento de DNA	Nome do primer	Direção do primer	Sequência do primer	Fonte do primer	Programa do PCR
COI	COI_Mil.tar_F	Forward	TATTTTATTTT	Morek et al. (2019)	Morek et al. (2019)
	f		GGTATTTGATGT		
	COI_Mil.tar_	Reverse	CCTCCCCCTGC		
	Rr		AGGATC		

External primary branch	2	14,1 – 17,5	35,9 – 35,9	15,8	35,9	2,4	0,0
External base + secondary branch	3	10,5 – 13,2	25,3 – 26,9	12,0	25,8	1,4	0,9
External spur	1	2,2 – 2,2	5,5 – 5,5	2,2	5,5	?	?
External branches length ratio	2	71% – 75%	–	73%	–	3%	–
Internal primary branch	3	12,0 – 17,2	22,9 – 35,2	14,2	30,7	2,7	6,8
Internal base + secondary branch	2	10,4 – 12,6	25,8 – 26,4	11,5	26,1	1,6	0,4
Internal spur	2	3,1 – 4,0	6,4 – 10,2	3,6	8,3	0,6	2,7
Internal branches length ratio	2	73% – 77%	–	75%	–	3%	–
Claw IV heights							
Anterior primary branch	3	17,0 – 23,4	34,9 – 45,4	19,4	41,7	3,5	5,9
Anterior base + secondary branch	3	12,9 – 14,7	28,1 – 32,9	14,1	30,4	1,0	2,4
Anterior spur	3	3,9 – 4,4	7,4 – 9,9	4,1	8,8	0,3	1,3
Anterior branches length ratio	3	63% – 87%	–	74%	–	12%	–
Posterior primary branch	3	17,8 – 22,7	43,1 – 45,4	20,5	44,0	2,5	1,2
Posterior base + secondary branch	3	13,6 – 16,5	31,6 – 34,7	15,2	32,7	1,5	1,7
Posterior spur	2	2,0 – 2,1	4,1 – 5,3	2,0	4,7	0,1	0,9
Posterior branches length ratio	3	73% – 76%	–	74%	–	2%	–

Table 4. Measurements and *pt* values of selected morphological structures of **hatchling** of *Milnesium iniquum* from **Santa Helena, Paraná, Brazil**. All the available specimens were measured (N = number of specimens measured; range = largest and smallest measured; SD = standard deviation).

CHARACTER	N	RANGE		MEAN	
		μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>
Body length	1	348 – 348	1274 – 1274	348	1274
Peribuccal papillae length	1	5,5 – 5,5	20,1 – 20,1	5,5	20,1
Lateral papillae length	1	4,3 – 4,3	15,8 – 15,8	4,3	15,8
Buccal tube					
Length	1	27,3 – 27,3	–	27,3	–
Stylet support insertion point	1	21,3 – 21,3	78,1 – 78,1	21,3	78,1
Anterior width	1	12,6 – 12,6	46,0 – 46,0	12,6	46,0
Standard width	1	12,6 – 12,6	46,0 – 46,0	12,6	46,0
Posterior width	1	11,8 – 11,8	43,0 – 43,0	11,8	43,0
Posterior/anterior width ratio	1	93% – 93%	–	93%	–
Claw I heights					
External primary branch	1	10,7 – 10,7	39,2 – 39,2	10,7	39,2
External base + secondary branch	1	8,1 – 8,1	29,7 – 29,7	8,1	29,7
External spur	0	?	?	?	?

External branches length ratio	1	76% – 76%	–	76%	–
Internal primary branch	1	10,2 – 10,2	37,5 – 37,5	10,2	37,5
Internal base + secondary branch	1	8,8 – 8,8	32,2 – 32,2	8,8	32,2
Internal spur	0	?	?	?	?
Internal branches length ratio	1	86% – 86%	–	86%	–
Claw II heights					
External primary branch	1	11,2 – 11,2	41,1 – 41,1	11,2	41,1
External base + secondary branch	1	7,8 – 7,8	28,6 – 28,6	7,8	28,6
External spur	0	?	?	?	?
External branches length ratio	1	70% – 70%	–	70%	–
Internal primary branch	1	9,5 – 9,5	34,6 – 34,6	9,5	34,6
Internal base + secondary branch	1	7,7 – 7,7	28,2 – 28,2	7,7	28,2
Internal spur	0	?	?	?	?
Internal branches length ratio	1	81% – 81%	–	81%	–
Claw III heights					
External primary branch	1	11,5 – 11,5	41,9 – 41,9	11,5	41,9
External base + secondary branch	1	7,8 – 7,8	28,6 – 28,6	7,8	28,6
External spur	0	?	?	?	?
External branches length ratio	1	68% – 68%	–	68%	–
Internal primary branch	1	10,6 – 10,6	38,8 – 38,8	10,6	38,8
Internal base + secondary branch	1	8,0 – 8,0	29,3 – 29,3	8,0	29,3
Internal spur	0	?	?	?	?
Internal branches length ratio	1	75% – 75%	–	75%	–
Claw IV heights					
Anterior primary branch	1	11,7 – 11,7	42,9 – 42,9	11,7	42,9
Anterior base + secondary branch	1	8,2 – 8,2	30,0 – 30,0	8,2	30,0
Anterior spur	1	1,3 – 1,3	4,7 – 4,7	1,3	4,7
Anterior branches length ratio	1	70% – 70%	–	70%	–
Posterior primary branch	1	13,0 – 13,0	47,6 – 47,6	13,0	47,6
Posterior base + secondary branch	1	8,4 – 8,4	30,8 – 30,8	8,4	30,8
Posterior spur	0	?	?	?	?
Posterior branches length ratio	1	65% – 65%	–	65%	–

Table 5. Measurements and *pt* values of selected morphological structures of **adult females** of *Milnesium iniquum* from **Patos de Minas, Minas Gerais**, Brazil. All the available specimens were measured (N = number of specimens measured; range = largest and smallest measured; SD = standard deviation).

CHARACTER	N	RANGE		MEAN		SD	
		μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>
Body length	9	403 – 647	1073 – 1415	531	1222	75	109
Peribuccal papillae length	4	8,6 – 10,5	19,2 – 23,6	9,6	21,1	1,0	1,9
Lateral papillae length	5	5,4 – 8,1	13,8 – 19,5	7,2	17,3	1,1	2,1
Buccal tube							
Length	8	30,5 – 51,0	–	43,3	–	6,2	–
Stylet support insertion point	7	20,8 – 34,5	60,8 – 75,4	29,7	68,9	4,7	4,5
Anterior width	8	16,5 – 25,3	47,2 – 57,8	22,8	52,8	3,0	3,7
Standard width	8	17,0 – 26,6	50,2 – 58,8	23,4	54,1	3,0	2,9
Posterior width	8	16,5 – 25,3	49,0 – 55,3	22,7	52,6	2,8	2,5
Posterior/anterior width ratio	8	94% – 109%	–	100%	–	4%	–
Claw I heights							
External primary branch	6	10,0 – 17,0	32,9 – 38,3	15,3	34,3	2,6	2,3
External base + secondary branch	7	8,1 – 14,3	26,5 – 31,5	13,0	29,5	2,2	1,9
External spur	5	2,7 – 3,8	5,6 – 8,3	3,3	7,1	0,5	1,0
External branches length ratio	6	80% – 91%	–	85%	–	4%	–
Internal primary branch	6	11,3 – 17,0	33,3 – 36,9	15,2	35,0	2,1	1,7
Internal base + secondary branch	7	9,3 – 13,9	26,1 – 30,4	12,5	28,8	1,5	1,7
Internal spur	6	3,3 – 5,2	7,7 – 11,7	4,2	9,8	0,6	1,4
Internal branches length ratio	6	75% – 88%	–	83%	–	5%	–
Claw II heights							
External primary branch	7	12,6 – 19,0	36,1 – 42,2	16,9	38,7	2,1	2,6
External base + secondary branch	7	10,0 – 14,3	27,8 – 32,7	13,1	30,0	1,5	2,0
External spur	4	2,2 – 3,5	4,5 – 7,7	2,7	6,4	0,6	1,7
External branches length ratio	7	71% – 85%	–	77%	–	5%	–
Internal primary branch	6	11,0 – 17,9	35,6 – 40,5	15,9	37,5	2,5	1,9
Internal base + secondary branch	7	8,6 – 13,5	25,9 – 29,5	12,2	28,1	1,7	1,4
Internal spur	5	4,1 – 4,7	9,0 – 11,4	4,6	10,2	0,3	1,0
Internal branches length ratio	6	71% – 83%	–	76%	–	4%	–
Claw III heights							
External primary branch	5	13,3 – 18,6	36,0 – 45,3	16,7	40,7	2,1	4,5
External base + secondary branch	5	9,1 – 13,8	26,3 – 31,5	12,5	29,4	1,9	2,2
External spur	3	2,7 – 3,8	8,3 – 8,6	3,3	8,5	0,6	0,2
External branches length ratio	5	68% – 81%	–	74%	–	6%	–

Internal primary branch	6	12,3 – 17,9	33,4 – 43,6	16,2	39,1	2,2	3,8
Internal base + secondary branch	6	9,7 – 14,6	27,3 – 32,0	12,9	30,7	1,7	1,9
Internal spur	4	4,4 – 5,4	9,6 – 12,2	4,8	11,2	0,4	1,4
Internal branches length ratio	6	71% – 86%	–	80%	–	6%	–
Claw IV heights							
Anterior primary branch	7	15,6 – 21,0	41,0 – 51,2	19,7	45,5	1,9	3,9
Anterior base + secondary branch	7	10,4 – 16,6	30,6 – 39,4	15,3	35,3	2,2	3,0
Anterior spur	7	3,7 – 6,0	10,2 – 13,5	5,1	11,4	0,8	1,3
Anterior branches length ratio	7	67% – 83%	–	77%	–	6%	–
Posterior primary branch	7	15,5 – 22,7	41,0 – 53,5	20,8	47,6	2,5	5,1
Posterior base + secondary branch	7	10,4 – 18,6	33,1 – 40,7	16,0	36,4	2,7	2,7
Posterior spur	6	2,6 – 3,8	5,6 – 7,0	3,0	6,2	0,4	0,6
Posterior branches length ratio	7	67% – 87%	–	77%	–	8%	–

Table 6. Measurements and *pt* values of selected morphological structures of **hatchlings** of *Milnesium iniquum* from **Patos de Minas, Minas Gerais**, Brazil. All the available specimens were measured (N = number of specimens measured; range = largest and smallest measured; SD = standard deviation).

CHARACTER	N	RANGE		MEAN		SD	
		μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>
Body length	1						
	6	222 – 335	796 – 1175	279	995	27	105
Peribuccal papillae length	5	4,0 – 5,3	14,8 – 20,7	4,9	18,1	0,5	2,6
Lateral papillae length	1						
	6	4,0 – 5,1	13,4 – 19,5	4,5	16,3	0,3	1,8
Buccal tube							
Length	1						
	7	24,1 – 31,0	–	27,9	–	1,9	–
Stylet support insertion point	1						
	5	17,9 – 22,5	62,7 – 73,9	19,5	69,5	1,2	3,2
Anterior width	1						
	7	11,5 – 14,4	41,2 – 51,6	12,8	46,0	0,9	2,9
Standard width	1						
	7	10,8 – 12,8	35,7 – 49,3	12,0	42,9	0,6	3,0
Posterior width	1						
	7	10,5 – 13,4	34,9 – 55,6	11,6	41,9	0,7	4,4
Posterior/anterior width ratio	1						
	7	84% – 108%	–	91%	–	7%	–
Claw I heights							
External primary branch	1						
	7	8,7 – 10,8	30,0 – 40,8	9,6	34,4	0,6	2,8
External base + secondary branch	1						
	7	6,8 – 8,4	22,0 – 34,9	7,4	26,5	0,5	3,1
External spur	0	?	?	?	?	?	?

External branches length ratio	$\frac{1}{7}$	68% – 95%	–	77%	–	7%	–
Internal primary branch	$\frac{1}{7}$	8,8 – 10,4	29,4 – 39,7	9,6	34,6	0,5	2,5
Internal base + secondary branch	$\frac{1}{7}$	6,5 – 7,9	22,4 – 30,7	7,3	26,5	0,4	2,7
Internal spur	0	?	?	?	?	?	?
Internal branches length ratio	$\frac{1}{7}$	64% – 90%	–	77%	–	6%	–
Claw II heights							
External primary branch	$\frac{1}{7}$	8,8 – 11,5	29,3 – 40,2	10,1	36,4	0,8	2,5
External base + secondary branch	$\frac{1}{7}$	6,5 – 8,7	23,5 – 33,6	7,3	26,1	0,5	2,3
External spur	0	?	?	?	?	?	?
External branches length ratio	$\frac{1}{7}$	61% – 99%	–	72%	–	8%	–
Internal primary branch	$\frac{1}{7}$	7,8 – 11,4	28,5 – 43,6	9,8	35,3	0,8	3,4
Internal base + secondary branch	$\frac{1}{7}$	6,6 – 7,7	23,5 – 31,7	7,3	26,2	0,3	2,3
Internal spur	0	?	?	?	?	?	?
Internal branches length ratio	$\frac{1}{7}$	65% – 97%	–	75%	–	8%	–
Claw III heights							
External primary branch	$\frac{1}{7}$	9,7 – 11,9	32,2 – 41,8	10,4	37,4	0,6	2,9
External base + secondary branch	$\frac{1}{7}$	6,6 – 8,7	23,1 – 33,4	7,4	26,4	0,5	2,5
External spur	0	?	?	?	?	?	?
External branches length ratio	$\frac{1}{7}$	65% – 81%	–	71%	–	5%	–
Internal primary branch	$\frac{1}{6}$	9,0 – 11,1	32,2 – 43,6	10,3	37,3	0,5	2,9
Internal base + secondary branch	$\frac{1}{7}$	6,7 – 8,1	22,1 – 30,1	7,3	26,3	0,4	2,0
Internal spur	0	?	?	?	?	?	?
Internal branches length ratio	$\frac{1}{6}$	64% – 79%	–	71%	–	4%	–
Claw IV heights							
Anterior primary branch	$\frac{1}{5}$	10,1 – 12,3	34,4 – 44,8	10,9	39,2	0,7	3,1
Anterior base + secondary branch	$\frac{1}{6}$	7,5 – 8,6	24,3 – 34,2	8,0	28,7	0,3	2,5
Anterior spur	6	1,0 – 1,8	3,5 – 6,4	1,5	5,4	0,3	1,1
Anterior branches length ratio	$\frac{1}{5}$	68% – 81%	–	74%	–	4%	–
Posterior primary branch	$\frac{1}{5}$	10,1 – 12,0	34,3 – 45,6	11,2	40,2	0,6	3,1

Posterior base + secondary branch	1 6	7,0 – 9,4	24,6 – 35,3	8,1	29,1	0,6	3,1
Posterior spur	3	1,1 – 2,0	3,9 – 7,2	1,6	5,4	0,5	1,7
Posterior branches length ratio	1 5	62% – 81%	–	73%	–	5%	–

Table 7. Measurements and *pt* values of selected morphological structures of **adult females** of *Milnesium iniquum* from **San Miguel de Tucuman**, Argentina. All the available specimens were measured (N = number of specimens measured; range = largest and smallest measured; SD = standard deviation).

CHARACTER	N	RANGE		MEAN		SD	
		μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>
Body length	12	406 – 606	1027 – 1364	491	1219	74	105
Peribuccal papillae length	3	5,9 – 8,2	16,5 – 21,9	7,3	19,2	1,3	2,7
Lateral papillae length	7	4,9 – 9,8	13,4 – 21,9	6,6	16,6	2,0	3,1
Buccal tube							
Length	12	33,0 – 45,6	–	40,3	–	4,6	–
Stylet support insertion point	12	23,8 – 34,7	63,8 – 78,9	28,7	71,3	3,4	4,7
Anterior width	12	15,7 – 24,4	42,6 – 54,8	19,9	49,1	3,6	4,0
Standard width	12	16,3 – 26,2	43,7 – 57,5	20,2	49,9	3,5	4,4
Posterior width	12	15,6 – 24,2	41,8 – 53,1	19,1	47,2	3,3	4,1
Posterior/anterior width ratio	12	88% – 104%	–	96%	–	5%	–
Claw I heights							
External primary branch	11	11,2 – 20,4	31,7 – 44,7	14,7	35,9	2,9	3,8
External base + secondary branch	12	8,7 – 13,9	23,3 – 30,5	11,0	27,2	1,7	2,2
External spur	7	1,3 – 3,1	3,1 – 6,7	2,2	5,4	0,6	1,3
External branches length ratio	11	68% – 87%	–	76%	–	6%	–
Internal primary branch	11	11,2 – 19,0	32,2 – 41,6	14,5	35,5	2,5	3,0
Internal base + secondary branch	12	9,4 – 13,8	23,3 – 30,3	10,9	27,1	1,5	2,0
Internal spur	12	2,8 – 5,2	7,3 – 11,7	3,7	9,3	0,8	1,5
Internal branches length ratio	11	67% – 86%	–	77%	–	5%	–
Claw II heights							
External primary branch	12	12,6 – 21,1	33,6 – 46,3	15,7	38,9	2,6	3,2
External base + secondary branch	12	8,7 – 15,0	24,0 – 32,9	11,1	27,3	2,1	2,8
External spur	7	1,6 – 3,2	4,7 – 7,2	2,2	5,5	0,6	0,8
External branches length ratio	12	58% – 83%	–	70%	–	6%	–
Internal primary branch	12	12,4 – 21,5	31,0 – 47,1	15,3	37,9	2,7	4,1
Internal base + secondary branch	12	8,6 – 13,9	22,9 – 30,5	10,6	26,4	1,6	2,0
Internal spur	11	3,0 – 4,6	7,2 – 10,8	3,7	9,0	0,7	1,2

Internal branches length ratio	12	60% – 79%	–	70%	–	5%	–
Claw III heights							
External primary branch	10	13,0 – 22,1	33,0 – 48,5	16,0	39,4	3,2	4,4
External base + secondary branch	12	8,9 – 14,8	23,4 – 32,5	11,0	27,4	1,8	2,7
External spur	5	1,5 – 5,2	4,1 – 11,8	2,8	6,7	1,5	3,0
External branches length ratio	10	58% – 76%	–	69%	–	5%	–
Internal primary branch	10	12,9 – 21,3	31,9 – 46,7	15,7	38,8	2,9	4,3
Internal base + secondary branch	12	8,8 – 14,0	22,2 – 30,7	10,7	26,7	1,7	2,6
Internal spur	10	2,8 – 5,4	6,4 – 12,1	3,8	9,4	0,8	2,0
Internal branches length ratio	10	61% – 77%	–	68%	–	5%	–
Claw IV heights							
Anterior primary branch	10	15,5 – 22,2	37,1 – 51,2	18,4	46,4	2,5	4,7
Anterior base + secondary branch	11	11,0 – 15,4	26,3 – 34,4	12,7	31,8	1,6	2,5
Anterior spur	8	3,4 – 5,6	8,4 – 12,3	4,0	9,9	0,7	1,3
Anterior branches length ratio	9	58% – 78%	–	69%	–	7%	–
Posterior primary branch	10	16,7 – 22,6	38,9 – 53,0	19,1	48,1	2,3	4,2
Posterior base + secondary branch	11	11,8 – 15,9	27,6 – 36,5	13,5	33,9	1,6	2,7
Posterior spur	3	1,9 – 3,1	5,4 – 6,8	2,5	6,0	0,6	0,7
Posterior branches length ratio	9	67% – 81%	–	72%	–	4%	–

Table 8. Measurements and *pt* values of selected morphological structures of **hatchlings** of *Milnesium iniquum* from **San Miguel de Tucuman**, Argentina. All the available specimens were measured (N = number of specimens measured; range = largest and smallest measured; SD = standard deviation).

CHARACTER	N	RANGE		MEAN		SD	
		μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>	μm	<i>pt</i>
Body length	3	311 – 342	1018 – 1152	322	1081	17	67
Peribuccal papillae length	1	4,8 – 4,8	16,4 – 16,4	4,8	16,4	?	?
Lateral papillae length	2	4,6 – 5,1	15,1 – 17,4	4,9	16,3	0,4	1,7
Buccal tube							
Length	3	29,2 – 30,5	–	29,8	–	0,6	–
Stylet support insertion point	3	21,2 – 23,9	69,8 – 80,3	22,1	74,2	1,5	5,4
Anterior width	3	11,7 – 14,5	40,1 – 47,5	13,4	44,9	1,5	4,1
Standard width	3	12,5 – 14,0	42,7 – 45,9	13,3	44,6	0,8	1,6
Posterior width	3	12,5 – 13,8	42,7 – 45,2	13,2	44,2	0,7	1,3
Posterior/anterior width ratio	3	95% – 107%	–	99%	–	7%	–
Claw I heights							
External primary branch	2	10,7 – 12,3	35,1 – 41,5	11,5	38,3	1,2	4,5

External base + secondary branch	3	8,1 – 8,4	27,5 – 27,7	8,2	27,6	0,2	0,1
External spur	0	?	?	?	?	?	?
External branches length ratio	2	66% – 79%	–	73%	–	9%	–
Internal primary branch	3	11,0 – 11,3	36,6 – 38,7	11,2	37,5	0,2	1,1
Internal base + secondary branch	3	7,3 – 8,5	24,5 – 27,7	7,8	26,3	0,6	1,7
Internal spur	0	?	?	?	?	?	?
Internal branches length ratio	3	66% – 76%	–	70%	–	5%	–
Claw II heights							
External primary branch	3	11,8 – 12,1	38,6 – 41,4	12,0	40,2	0,2	1,4
External base + secondary branch	3	7,2 – 8,1	24,6 – 27,1	7,7	25,8	0,4	1,2
External spur	0	?	?	?	?	?	?
External branches length ratio	3	60% – 67%	–	64%	–	4%	–
Internal primary branch	3	11,8 – 12,0	39,2 – 40,2	11,9	39,8	0,1	0,5
Internal base + secondary branch	3	7,5 – 8,1	25,2 – 26,5	7,7	25,8	0,3	0,6
Internal spur	0	?	?	?	?	?	?
Internal branches length ratio	3	63% – 68%	–	65%	–	2%	–
Claw III heights							
External primary branch	2	11,4 – 11,5	38,3 – 39,3	11,5	38,8	0,1	0,7
External base + secondary branch	3	8,1 – 8,2	27,0 – 27,7	8,2	27,4	0,1	0,3
External spur	0	?	?	?	?	?	?
External branches length ratio	2	70% – 71%	–	71%	–	1%	–
Internal primary branch	2	11,1 – 11,9	37,9 – 39,9	11,5	38,9	0,6	1,5
Internal base + secondary branch	3	7,1 – 8,5	24,2 – 27,9	7,8	26,0	0,7	1,8
Internal spur	0	?	?	?	?	?	?
Internal branches length ratio	2	64% – 65%	–	65%	–	1%	–
Claw IV heights							
Anterior primary branch	1	12,2 – 12,2	39,9 – 39,9	12,2	39,9	?	?
Anterior base + secondary branch	2	8,7 – 9,5	28,7 – 32,0	9,1	30,3	0,5	2,3
Anterior spur	0	?	?	?	?	?	?
Anterior branches length ratio	1	72% – 72%	–	72%	–	?	–
Posterior primary branch	1	12,7 – 12,7	41,7 – 41,7	12,7	41,7	?	?
Posterior base + secondary branch	2	9,0 – 9,6	30,3 – 31,5	9,3	30,9	0,4	0,9
Posterior spur	0	?	?	?	?	?	?
Posterior branches length ratio	1	75% – 75%	–	75%	–	?	–

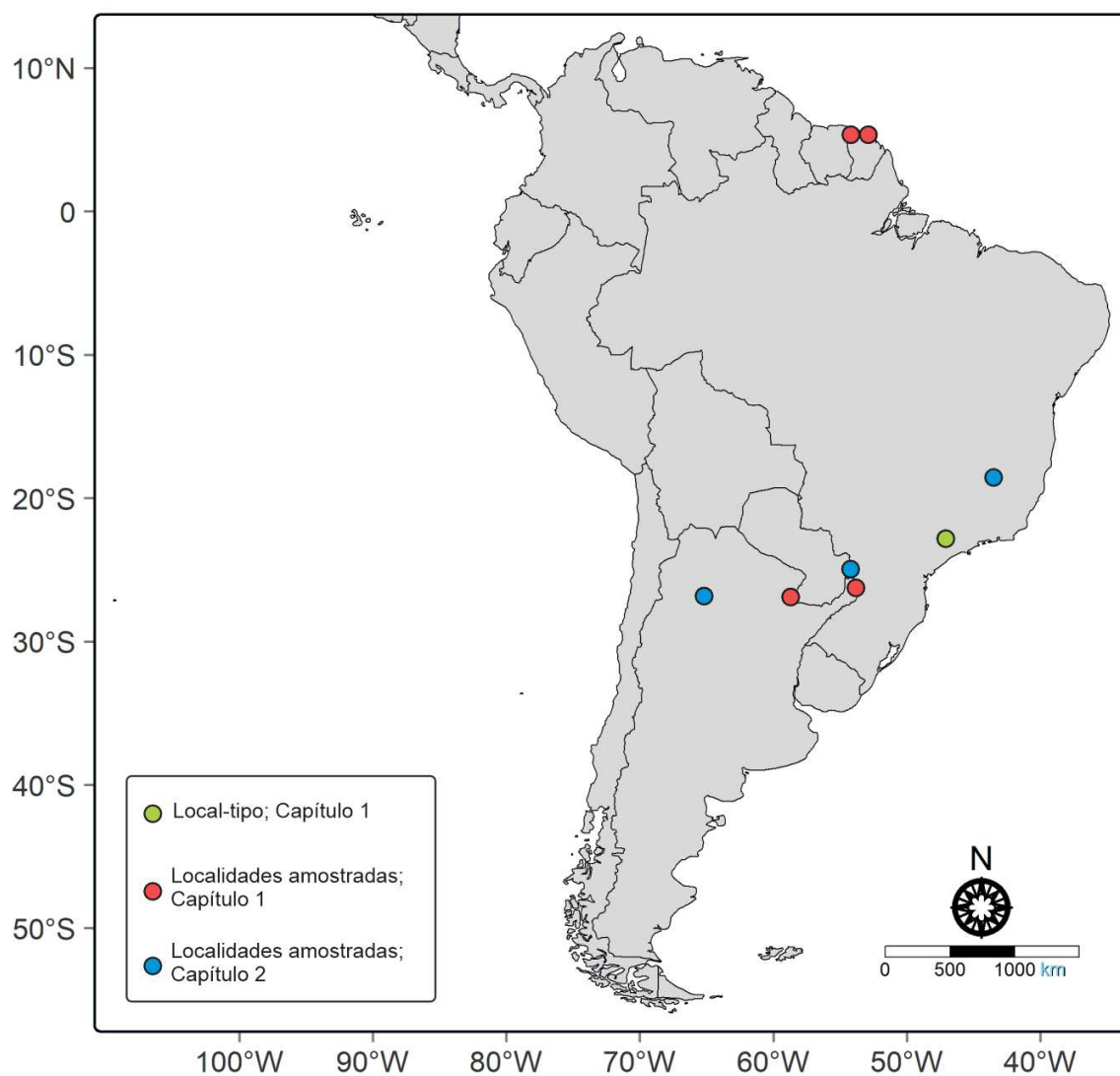


Fig. 1. Mapa da América do Sul indicando os locais de coleta amostrados. Ponto verde indica a localidade da população-tipo de *Milnesium iniquum* (Campinas, SP, Brasil); pontos vermelhos indicam outras localidades amostradas no estudo referente ao Capítulo 1 (Argentina e Guiana Francesa); pontos azuis indicam as localidades amostradas no presente estudo, referente ao Capítulo 2 (Patos de Minas, MG e Santa Helena, PR, Brasil; San Miguel de Tucumán).

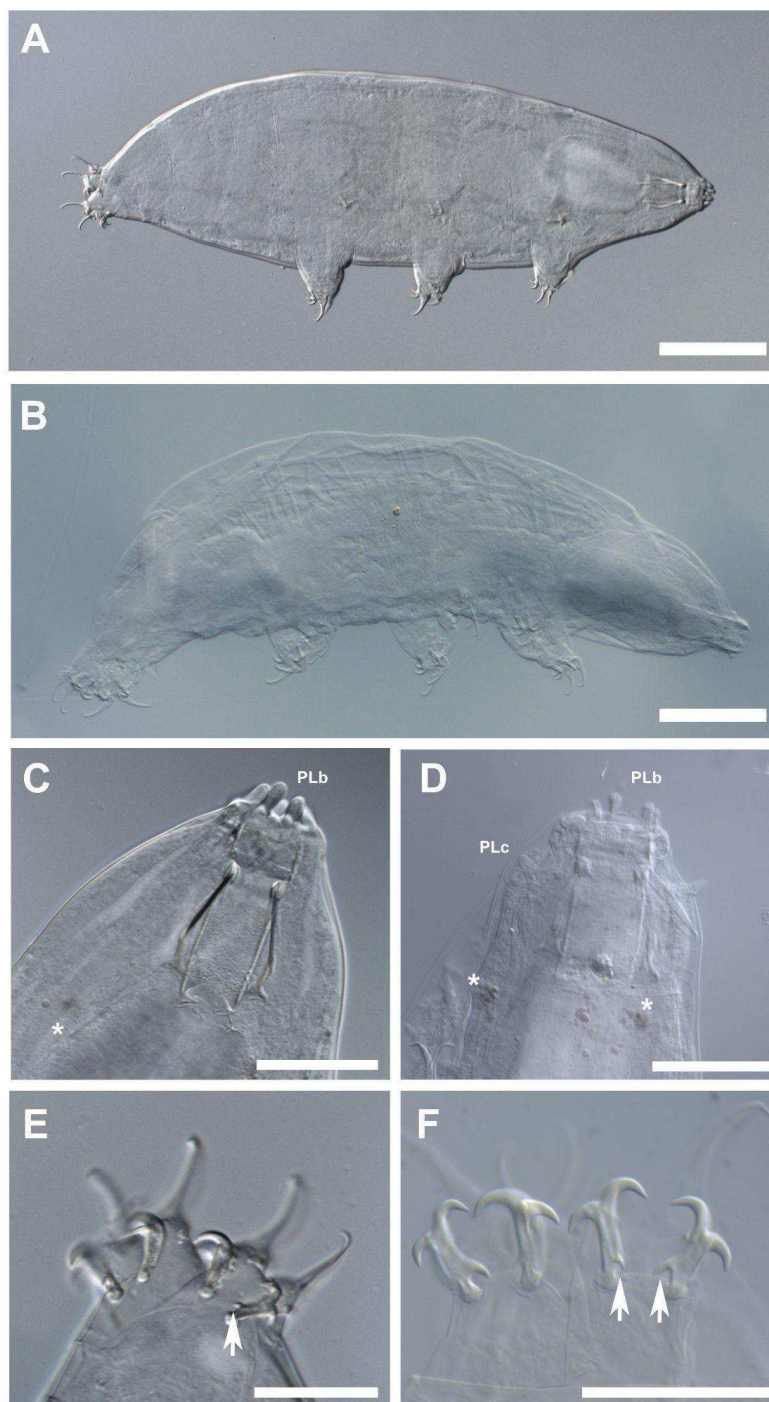


Fig. 2. *Milnesium iniquum* (DIC). A- Hábito de espécime coletado em San Miguel de Tucumán. B- Hábito de espécime coletado em Patos de Minas. C- Região cefálica de espécime coletado em San Miguel de Tucumán. D- Região cefálica de espécime coletado em Patos de Minas. E- Garras IV de espécime coletado em San Miguel de Tucumán. F- Garras IV de espécime coletado em Patos de Minas. PLb indica papilas peribucais; PLc indica papilas cefálicas; * indica olhos; setas brancas indicam esporas dos ramos secundários das garras. Barras de escala: A-B = 100 μ m; C-D = 50 μ m; E = 20; F = 30 μ m.

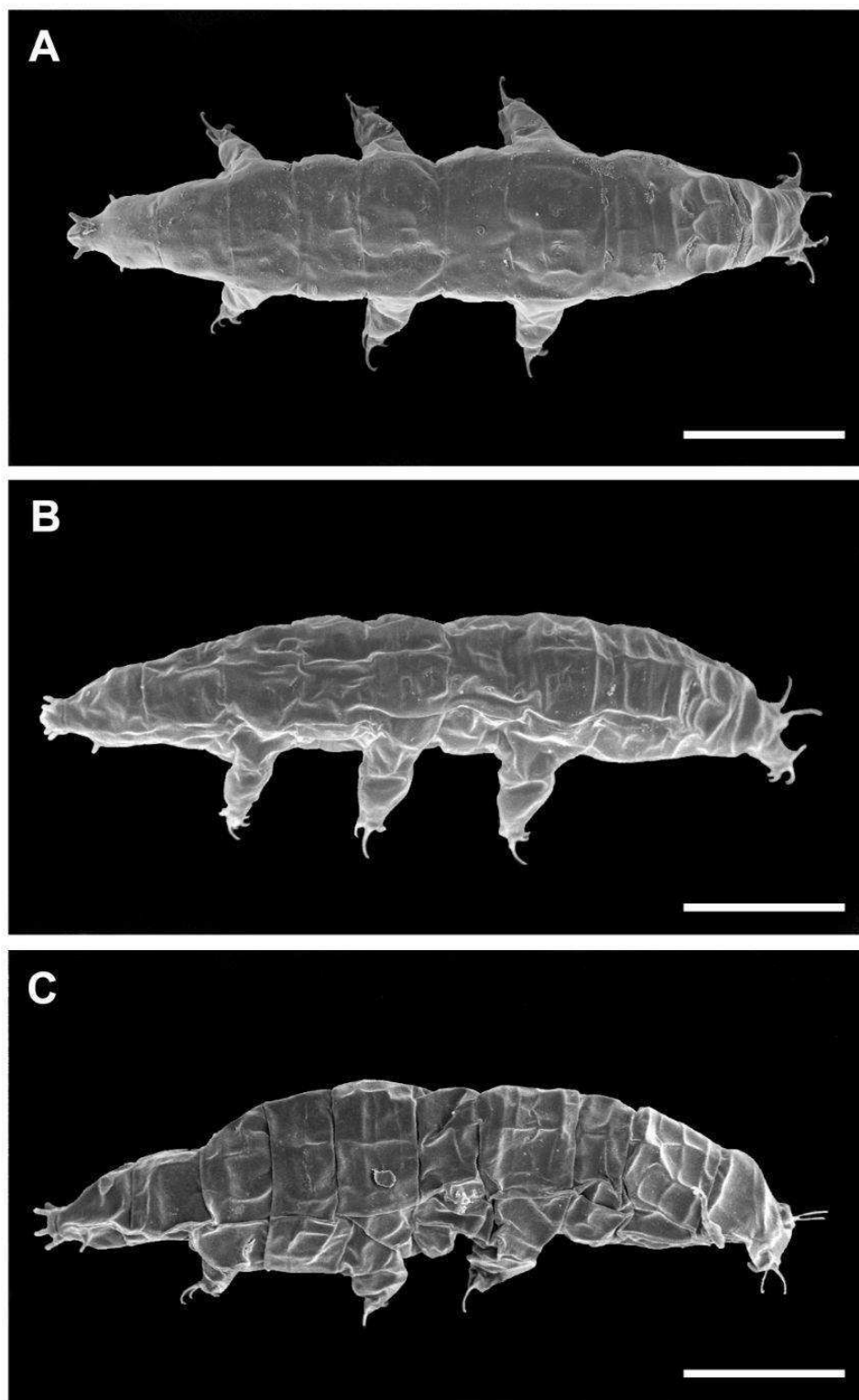


Fig. 3. *Milnesium iniquum* (MEV). A- Hábito de espécime coletado em San Miguel de Tucumán. B- Hábito de espécime coletado em Patos de Minas. C- Hábito de espécime coletado em Santa Helena. Barras de escala = 100μm.

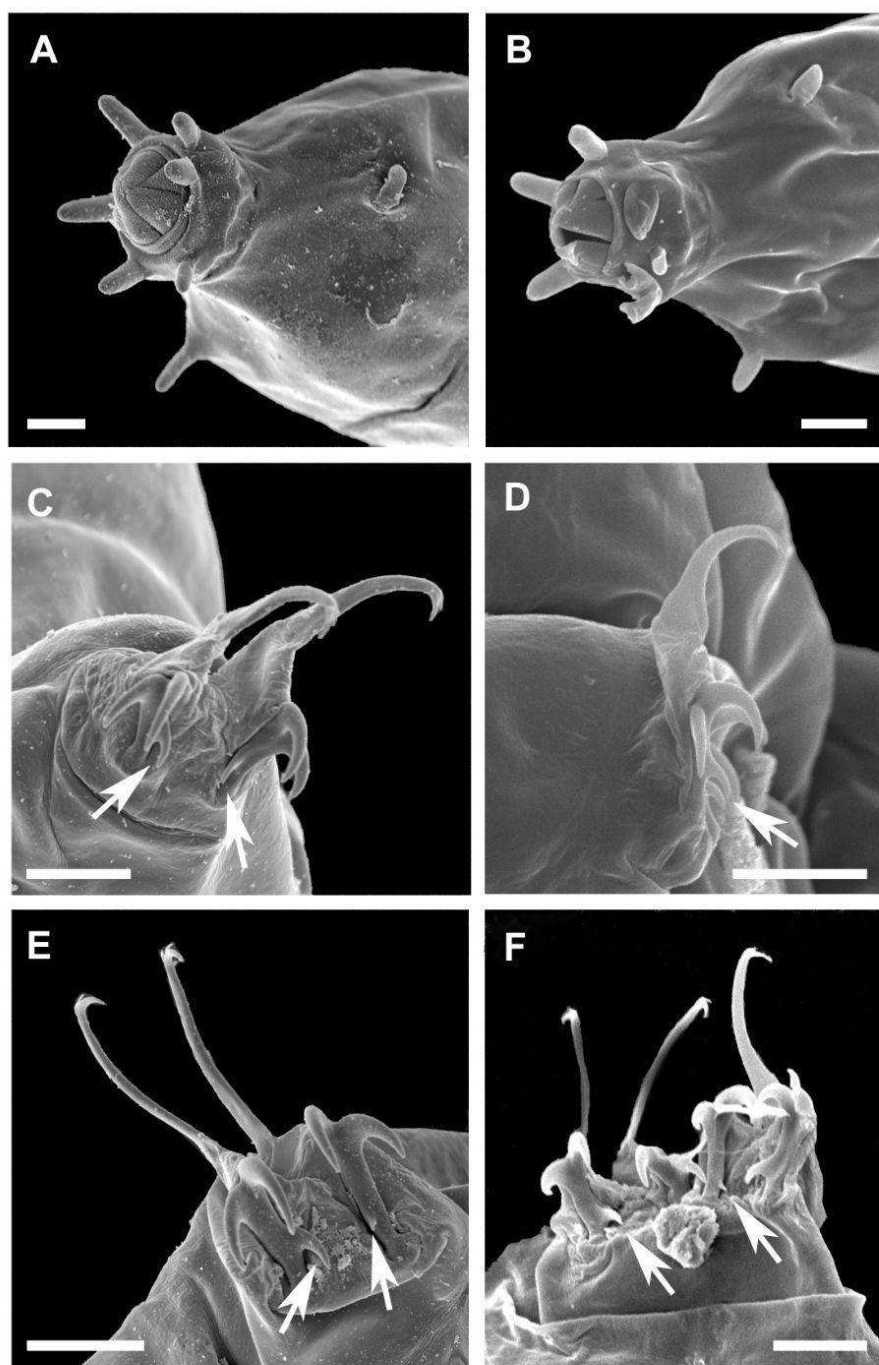


Fig. 4. *Milnesium iniquum* (MEV). A- Lamelas, papilas peribucais e cefálicas de espécime coletado em San Miguel de Tucumán. B- Lamelas, papilas peribucais e cefálicas de espécime coletado em Patos de Minas. C- Garras I-III de espécime coletado em San Miguel de Tucumán. D- Garras I-III de espécime coletado em Santa Helena. E- Garras IV de espécime coletado em San Miguel de Tucumán. F- Garras IV de espécime coletado em Santa Helena. Setas brancas indicam esporas dos ramos secundários. Barras de escala = 10μm.

	AR000	AR000	BR001	BR001	BR001	BR002	BR002	BR000	BR000	BR000	BR000	AR470	US071	AR437	GF089	GF083	GF196	ZA545	KG012	ZA015	RO002	IS008_A	ID916 um_v
M_iniquum1_AR000																							
M_iniquum2_AR000	0,02																						
M_iniquum1_BR001	0,02	0,01																					
M_iniquum2_BR001	0,02	0,01	0																				
M_iniquum3_BR001	0,02	0,01	0,01	0,01																			
M_iniquum1_BR002	0,02	0,03	0,03	0,04	0,03																		
M_iniquum2_BR002	0,02	0,03	0,03	0,04	0,03	0,02																	
M_iniquum1_BR000	0,03	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04																
M_iniquum2_BR000	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,05	0,05	0															
M_iniquum3_BR000	0,03	0,02	0,01	0,02	0,02	0,04	0,04	0	0,01														
M_iniquum_AR470	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0										
Milnesium_sp_US071	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02									
M_iniquum_AR437	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02	0,04	0,04	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02									
M_iniquum_GF089	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03									
M_iniquum_GF083	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,02	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,01								
M_iniquum_GF196	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,02	0,03	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02							
Milnesium_sp_ZA545	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06						
Milnesium_reductum_KG012	0,16	0,16	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,17	0,16	0,16	0,16	0,15					
Milnesium_sp_ZA015	0,16	0,17	0,17	0,17	0,17	0,16	0,17	0,17	0,18	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,16	0,16	0,16	0,16	0,18				
Milnesium_berladnicorum_RO002	0,21	0,21	0,22	0,22	0,21	0,2	0,22	0,22	0,23	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,2	0,19	0,19	0,21	0,22	0,19			
Milnesium_pseudotardigradum_IS008_A	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,23	0,21	0,21	0,22	0,23	0,23	0,22	0,15		
Milnesium_sp_ID916	0,22	0,22	0,23	0,23	0,22	0,23	0,22	0,22	0,23	0,22	0,22	0,22	0,22	0,23	0,22	0,22	0,22	0,23	0,23	0,21	0,18	0,2	
Milnesium_wrightae	0,24	0,25	0,25	0,25	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,25	0,24	0,24	0,23	0,25	0,24	0,22	0,19	0,22	0,09

Fig. 5. Recorte da tabela contendo resultados da análise de distâncias genéticas utilizando sequências de COI de espécies de *Milnesium*. Em negrito estão as sequências identificadas como *M. iniquum*. Fundo verde - sequências da população-tipo (Capítulo 1); fundo vermelho - demais sequências obtidas no estudo referente ao Capítulo 1; fundo azul - sequências obtidas no presente estudo (Capítulo 2). Demais sequências disponíveis no *GenBank*.

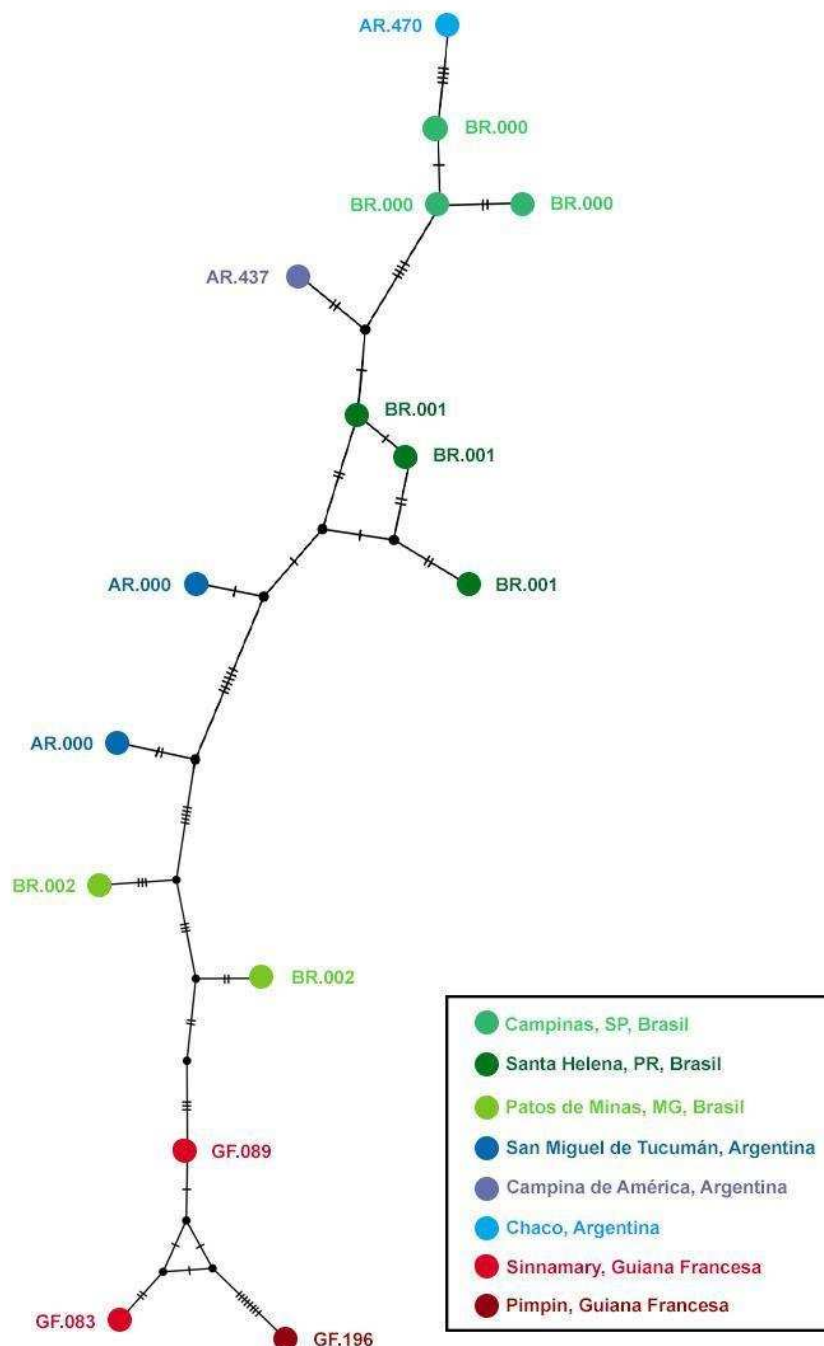


Fig. 6. Rede de haplótipos de *M. iniquum* gerada por Neighbor-Joining. As cores representam diferentes localidades amostradas. Tons de verde referem-se a espécimes coletados no Brasil, tons de azul referem-se a espécimes coletados na Argentina e tons de vermelho referem-se a espécimes coletados na Guiana Francesa. Pontos pretos indicam haplótipos de conexão ausentes, não amostrados ou extintos. Barras pretas denotam múltiplos haplótipos ausentes.

| CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho possibilitaram descrever de forma integrativa, de acordo com os padrões taxonômicos atuais, uma espécie nova de tardígrado limnoterrestre verdadeiramente Neotropical. Além disso, demonstram que *Milnesium iniquum* pode ser encontrada em uma ampla variedade de locais e possui, portanto, um padrão de distribuição abrangente na América do Sul. Se essa distribuição é reflexo da habilidade de dispersão intrínseca à espécie, ou resultado de fatores antropológicos que facilitam sua disseminação, ou ainda, tem uma origem paleogeográfica, são questionamentos que se levantam e abrem portas para novos estudos. Isso mostra que ainda é difícil estimar exatamente a diversidade e os limites de distribuição de animais tão pequenos e pouco estudados, reforçando a importância de investir esforços em ampliar as áreas de amostragem e realizar estudos taxonômicos com técnicas integradas que auxiliem na identificação correta.

Por apresentar uma baixa variabilidade intraespecífica, com apenas algumas variações morfométricas entre uma população e outra, uma análise morfológica cuidadosa é suficiente para realizar a identificação. Porém, é preciso ressaltar que a variabilidade ontogenética (as mudanças morfológicas observadas entre os indivíduos mais jovens e os adultos) presente nessa espécie pode gerar erros de identificação, sendo portanto altamente recomendável a coleta de exúvias com ovos ou criação em laboratório para análise dos espécimes em diferentes *instars*. Além disso, a análise molecular auxilia em uma identificação mais precisa e ressalta a importância dos bancos de dados com sequências genéticas para estudos taxonômicos, filogenéticos e ecológicos mais completos.

Por fim, fica evidente a importância da formação de taxonomistas especialistas em grupos negligenciados, para produzir trabalhos que contribuam com o conhecimento da fauna de regiões que são, também, muitas vezes negligenciadas.

| REFERÊNCIAS

- Altiero, T., Suzuki, A. C., & Rebecchi, L. (2018). Reproduction, development and life cycles. In: Schill, R. (eds) *Water Bears: The Biology of Tardigrades*. Zoological Monographs, vol 2. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_8
- Baas Beeking, L. G. M. (1934). *Geobiologie of Inleiding tot de Milieukunde*. Den Haag, Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon.
- Baccetti, B., & Rosati, F. (1971). Electron microscopy on tardigrades. III. The integument. *J. Ultrastruct. Res.*, 34(3-4), 214-243. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(71\)80069-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(71)80069-2)
- Bartels, P. J., Nelson, D. R., Exline, R. P. (2011). Allometry and the removal of body size effects in the morphometric analysis of tardigrades. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 49, 17-25. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00593.x>
- Brandoli, S., Cesari, M., Massa, E., Vecchi, M., Rebecchi, L., & Guidetti, R. (2024). Diverse eggs, diverse species? Production of two egg morphotypes in *Paramacrobiotus bifrons*, a new eutardigrade species within the areolatus group. *Eur. Zool. J.*, 91(1), 274-297. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2317465>
- Bryndová, M., Stec, D., Schill, R. O., Michalczyk, Ł., & Devetter, M. (2020). Dietary preferences and diet effects on life-history traits of tardigrades. *Zool. J. Linn. Soc.*, 188(3), 865-877. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlzl46>
- Corti, B. (1774). *Observazioni microscopiche Sulla Tremella*.
- Czerneková, M., & Vinopal, S. (2021). The tardigrade cuticle. *Limnol. Rev.*, 21(3), 127-146. <https://doi.org/10.2478/limre-2021-0012>
- da Rocha, C. M. C., Gomes Júnior, E. L., & Santos, E. C. L. (2016). Brazilian limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada): new occurrences and species checklist updates. *Rev. Nord. Zool.*, 10(1), 21-31.
- de Barros, R. (1938). *Macrobiotus evelinae* nova espécie dos tardígrados. *Bol. Biol.* 3, 52–54.
- de Barros, R. (1939a). *Pseudechiniscus juanita* nova espécie de tardígrado. *Bol. Biol.* 4, 367–368.

- de Barros, R. (1939b). *Itaquascon umbellinae* gen. nov. spec. nov (Tardigrada, Macrobiotidae). Zool. Anz. 128, 106–109.
- de Barros, R. (1942a). Tardígrados do Estado de São Paulo, Brasil. I. Introdução. Gêneros *Echiniscus* e *Pseudoechiniscus*. Rev. Bras. Biol. 2, 257-259.
- de Barros, R. (1942b). Tardígrados do Estado de São Paulo, Brasil. II. Gênero *Macrobiotus*. Rev. Bras. Biol. 2, 373-386.
- de Barros, R. (1943). Tardígrados do Estado de São Paulo, Brasil. III. Gêneros *Hypsibius*, *Itaquascon* e *Milnesium*. Rev. Bras. Biol. 3, 1-10.
- de Barros, R. C. (2020). Tardigrades Research in Brazil: an overview and updated checklist. Arq. Zool., 51(1), 1-11. <https://doi.org/10.11606/2176-7793/2020.51.01>
- Degma, P. & Guidetti, R. (2024). Actual checklist of Tardigrada species. https://doi.org/10.25431/11380_1178608
- Drummond, A., Suchard, M. A., Xie, D., Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol. Biol. Evol., 22, 1185–1192. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- du Bois-Reymond Marcus, E. (1944). Sobre tardígrados brasileiros. Com. Zool. Mus. Montevideo 1, 1–19.
- du Bois-Reymond Marcus, E. (1952). On South American Malacopoda. Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. U. São Paulo Zool., 17: 189-209.
- Ehrenberg, C.G. (1853). Diagnoses novarum formarum. Verhandlungen der Königlich Preussische Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 8, 526–533
- Eichhorn, J. C. E. (1775). Beyträge zur Natur-Geschichte der kleinsten Wasser-Thiere die mit keinem blossen Auge können gesehen werden und die sich in den Gewässern in und um Danzig befinden. Johann Emanuel Friedrich Müller, Danzig
- Garey, J. R., Krotec, M., Nelson, D. R., & Brooks, J. (1996). Molecular analysis supports a tardigrade-arthropod association. Invertebr. Biol. 79-88. <https://doi.org/10.2307/3226943>
- Garraffoni, A. R., Campos, A., Minowa, A. K., Santos, É., Moura, M., Barros, R. C. D., & Araújo, T. Q. (2024). Expanding the taxonomic catalog of Brazilian meiofauna: diversity and

distribution of the neglected phyla Tardigrada, Gastrotricha, and Kinorhyncha. *Zoologia* (Curitiba), 41. <https://doi.org/10.1590/S1984-4689.v41.e23060>

Gąsiorek, P. (2023). Catch me if you can, or how paradigms of tardigrade biogeography evolved from cosmopolitanism to ‘localism’. *Zool. J. Linn. Soc.*, 202(2). <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad191>

Giribet, G., Carranza, S., Baguña, J., Riutort, M., & Ribera, C. (1996). First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Mol. Biol. Evol.*, 13(1), 76-84. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025573>

Goeze, J.A.E. (1773). Schluß der Anzeige eines, nach einer neuen Art, von Herrn Samuel Gottlieb Hoffmann, Optikus in Leipzig, verfertigten zusammengesetzten Mikroskopii, nebst einigen mit demselben angestellten Beobachtungen. *Hannoverische Anzeigen von allerhand Sachen, deren Bekanntmachung dem gemeinen Wesen nöthig und nützlich. Vom Jahre 1772 Hannoverisches Magazin* 10, 1153-1164.

Goldstein, B. (2022). Tardigrades and their emergence as model organisms. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 147, pp. 173-198). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2021.12.008>

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. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2016026>

Greven, H., & Greven, W. (1987). Observations on the permeability of the tardigrade cuticle using lead as an ionic tracer. In *Biology of the Tardigrades, Selected Symposia and Monographs. UZI* (Vol. 1, pp. 35-43). Mucchi Modena, Italy.

Greven, H. (2018). From Johann August Ephraim Goeze to Ernst Marcus: A Ramble Through the History of Early Tardigrade Research (1773 Until 1929). In: Schill, R. (eds) *Water Bears: The Biology of Tardigrades. Zoological Monographs*, vol 2. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_1

Guidetti, E. B., Campos, A., Batistão, A. R., Silva, A. T. D., Bilatto, C. G., Salgado, K. A., ... & Garraffoni, A. R. S. (2021). Gastrotrichs and tardigrades in a remnant of Atlantic Forest

(Serra do Japi, SP, Brazil). *Biota Neotrop.*, 21.
<https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1165>

Guil, N., & Cabrero-Sanudo, F. J. (2007). Analysis of the species description process for a little known invertebrate group: the limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada). *Vertebrate Conservation and Biodiversity*, 237-260.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6320-6_16

Hall, T., BioSciences, I., & Carlsbad, C. J. G. B. B. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF bull biosci*, 2(1), 60-61.

Jørgensen, A., Kristensen, R.M., Møbjerg, N. (2018). Phylogeny and Integrative Taxonomy of Tardigrada. In: Schill, R. (eds) *Water Bears: The Biology of Tardigrades*. Zoological Monographs, vol 2. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_3

Kaczmarek, Ł., Michalczyk, Ł., & McInnes, S. J. (2015). Annotated zoogeography of non-marine Tardigrada. Part II: South America. *Zootaxa*, 3923 (1), 001–107.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3923.1.1>

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic. Acid. Resou.* 30, 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>

Katoh, K., Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief. Bioinformatics* 9, 286–298. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn013>

Kasianchuk, N., Rzymiski, P., & Kaczmarek, Ł. (2023). The biomedical potential of tardigrade proteins: A review. *Biomed. Pharmacother.*, 158.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114063>

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
<https://doi.org/10.1007/BF01731581>

Kinchin, I. M. (1994). *The Biology of Tardigrades*, p. 186. Portland Press, London.

Kristensen, R. M., & Neuhaus, B. (1999). Special issue on tardigrada-the ultrastructure of the tardigrade cuticle with special attention to marine species. *Zool. Anz.*, 238(3-4), 261-282.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lisi, O., Londono, R., & Quiroga, S. (2014). Tardigrada from a sub-Andean forest in the Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia) with the description of *Itaquascon pilatoi* sp. nov. *Zootaxa*, 3841(4), 551-562. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3841.4.5>
- Lisi, O., Daza, A., Londoño, R., & Quiroga, S. (2022). New species and records of tardigrades from a biological repository collection from the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 94. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220201522>
- Londoño, R., Daza, A., Lisi, O., & Quiroga, S. (2017). New species of waterbear *Minibiotus pentannulatus* (Tardigrada: Macrobiotidae) from Colombia. *Rev. Mex. Biodivers.*, 88(4), 807-814. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.040>
- Marcus, E. (1927). Zur Anatomie und Ökologie mariner Tardigraden. *Zool. Jahrb. (Abt. Syst.)*, 53: 487-588
- Marcus, E. (1928) IV: Bartierchen (Tardigrada). *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile nach ihren Merkmalen und nach ihrer Lebensweise*, 12, 1–226.
- Marcus, E. (1936). Tardigrada. *Das Tierreich*, 66: 1-340.
- Marcus, E. (1937). Sobre a anabiose dos Tardigrados, com descrição de uma nova espécie. *Boletim Biológico*, 3(5): 7-13.
- Maucci, W. (1991). Tre nuove specie di Eutardigradi della Groenlandia Meridionale. *Boll. Mus. Civ. Stor. Nat. Verona*, 15, 279–289
- Melo, J., Beltran-Pardo, E., Bernal, J. E., & Kaczmarek, L. (2015). New records of tardigrades from Colombia (Guatavita, Cundinamarca Department). *Turk. J. Zool.*, 39(3), 412-420. <https://doi.org/10.3906/zoo-1405-13>

- Michalczyk, Ł., Welnicz, W., Frohme, M., Kaczmarek, Ł. (2012). Redescriptions of three *Milnesium* Doyère, 1840 taxa (Tardigrada: Eutardigrada: Milnesiidae), including the nominal species for the genus. *Zootaxa* 3154, 1-20. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3154.1.1>
- Mironov, S. V., Dabert, J., Dabert, M. (2012). A new feather mite species of the genus *Proctophyllodes* Robin, 1877 (Astigmata: Proctophyllodidae) from the Long-tailed Tit *Aegithalos caudatus* (Passeriformes: Aegithalidae): morphological description with DNA barcode data. *Zootaxa* 3253, 54-61. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3253.1.2>
- Møbjerg, N., Halberg, K. A., Jørgensen, A., Persson, D., Bjørn, M., Ramløv, H., & Kristensen, R. M. (2011). Survival in extreme environments—on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiol.*, 202(3), 409-420. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02252.x>
- Møbjerg, N., Jørgensen, A., Kristensen, R. M., & Neves, R. C. (2018). Morphology and functional anatomy. In: Schill, R. (eds) *Water Bears: The Biology of Tardigrades*. Zoological Monographs, vol 2. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_2
- Morek, W., Gąsiorek, P., Stec, D., Blagden, B., Michalczyk, Ł. (2016a). Experimental taxonomy exposes ontogenetic variability and elucidates the taxonomic value of claw configuration in *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada: Eutardigrada: Apochela). *Contrib. Zool.* 85, 173-200. <https://doi.org/10.1163/18759866-08502003>
- Morek, W., Stec, D., Gąsiorek, P., Schill, R. O., Kaczmarek, Ł., Michalczyk, Ł., (2016b). An experimental test of eutardigrade preparation methods for light microscopy. *Zool. J. Linn. Soc.* 178, 785-793. <https://doi.org/10.1111/zoj.12457>
- Morek, W., Stec, D., Gąsiorek, P., Surmacz, B., Michalczyk, Ł., (2019). *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840: The first integrative study of interpopulation variability in a tardigrade species. *J. Zool. Syst. Evol. Res* 57, 1-23. <https://doi.org/10.1111/jzs.12233>
- Morek, W., Blagden, B., Kristensen, R. M., & Michalczyk, Ł. (2020). The analysis of inter-and intrapopulation variability of *Milnesium eurytostomum* Maucci, 1991 reveals high genetic divergence and a novel type of ontogenetic variation in the order Apochela. *Syst. Biodivers.*, 18(6), 614-632. <https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1771469>

- Morek, W., Surmacz, B., López-López, A., & Michalczyk, Ł. (2021). “Everything is not everywhere”: Time-calibrated phylogeography of the genus *Milnesium* (Tardigrada). *Mol. Ecol.*, 30(14), 3590-3609. <https://doi.org/10.1111/mec.15951>
- Müller, O. F. (1785). Von den Bärthierchen. *Archiv der Insektengeschichte Teil I*, 6. Heft, 25–31 (Pl 36).
- Nederström, P. (1919). Die bis jetzt aus Finland bekannten Tardigraden. *Acta Soc. Fauna Flora Fenn.* 46(8): 1–25.
- Nelson, D. R., Guidetti, R., & Rebecchi, L. (2015). Phylum tardigrada. In Thorp and covich's freshwater invertebrates (pp. 347-380). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00017-6>
- Perry, E. S., Miller, W. R., Lindsay, S. (2015). Looking at tardigrades in a new light: using epifluorescence to interpret structure. *J. Microsc.* 257, 117-122. <https://doi.org/10.1111/jmi.12190>
- Pilato, G., (1981). Analisi di nuovi caratteri nello studio degli Eutardigradi. *Animalia*, 8, 51-57.
- Pilato, G., Binda, M. G. (1991). *Milnesium tetralamellatum*, New Species of Milnesiidae from Africa (Eutardigrada). *Trop. Zool.* 4, 103-106. <https://doi.org/10.1080/03946975.1991.10539480>
- Pilato, G. (2013). The past, the present and the future of eutardigrade taxonomy. *J. Limnol.*, 72. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s1.e1>
- Rahm, G. (1932). Freilebende Nematoden, Rotatorien und Tardigraden aus Südamerika (besonders aus Chile). *C. Tardigrada. Zool. Anz.*, 98: 113-128.
- Ramazzotti, G. (1962). Il Phylum Tardigrada. *Mem. Insti. Ital. Idrobiol. Dott. Marco. De Marchi*, 14, 1–732.
- Ramazzotti, G., & Maucci, W. (1983). The phylum Tardigrada—3rd edition: English translation by CW Beasley. *Mem. Inst. Ital. Idrobiol. Dott. Marco de Marchi*, 41.
- Richters, F. (1926). Tardigrada. *Handbuch der Zoologie Vol 3*, 1-68.

- Rocha, A., Doma, I., González-Reyes, A., & Lisi, O. (2020). Two new tardigrade species (Echiniscidae and Doryphoribiidae) from the Salta province (Argentina). *Zootaxa*, 4878(2), 267-286. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4878.2.3>
- Rocha, A., Camarda, D., Ostertag, B., Doma, I., Meier, F., & Lisi, O. (2023). Actual state of knowledge of the limno-terrestrial tardigrade fauna of the Republic of Argentina and new genus assignment for *Viridiscus rufoviridis* (du Bois-Reymond Marcus, 1944). *Diversity*, 15(2), 222. <https://doi.org/10.3390/d15020222>
- Rocha, A., Doma, I. L., Camarda, D., Ostertag, B. R., Meier, M. F., Frigieri, F., ... & Lisi, O. (2024). Integrative description of a new species of *Minibiotus* (Tardigrada: Macrobiotidae) from Salta City (Argentina). <http://dx.doi.org/10.5852/ejt.2024.958.2663>
- Roszkowska, M., Ostrowska, M., & Kaczmarek, Ł. (2015). The genus *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada) in South America with descriptions of two new species from Argentina and discussion of the feeding behaviour in the family Milnesiidae. *Zool. Stud.*, 54, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40555-014-0082-7>
- Sands, C. J., McInnes, S. J., Marley, N., Goodall-Copestake, W. P., Convey, P., Linse, K., (2008). Phylum Tardigrada: An individual approach. *Cladistics* 24, 861-871. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00219.x>
- Schuster, R. O., Nelson, D. R., Grigarick, A. A., & Christenberry, D. (1980). Systematic criteria of the Eutardigrada. *Trans. Am. Micros. Soc.*, 284-303. <https://doi.org/10.2307/3226004>
- Spallanzani L (1776) *Opuscoli di Fisica animale, e vegetabile*. Società Tipografica, Modena.
- Stec, D., Smolak, R., Kaczmarek, Ł., Michalczyk, Ł. (2015). An integrative description of *Macrobiotus paulinae* sp. nov. (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidae: hufelandi group) from Kenya. *Zootaxa* 4052, 501-526. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4052.5.1>
- Stec, D., Gąsiorek, P., Morek, W., Kosztyła, P., Zawierucha, K., Michno, K., Michalczyk, Ł. (2016). Estimating optimal sample size for tardigrade morphometry. *Zool. J. Linn. Soc.* 178, 776-784. <https://doi.org/10.1111/zoj.12404>
- Surmacz, B., Morek, W., & Michalczyk, Ł. (2019). What if multiple claw configurations are present in a sample? A case study with the description of *Milnesium pseudotardigradum* sp.

nov.(Tardigrada) with unique developmental variability.Zool. Stud., 58.
<https://doi.org/10.6620/ZS.2019.58-32>

Telford, M. J., Bourlat, S. J., Economou, A., Papillon, D., & Rota-Stabelli, O. (2008). The evolution of the Ecdysozoa. Philos. Trans. R. Soc. B.: Biological Sciences, 363(1496), 1529-1537. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2243>

Tumanov, D. V., (2006). Five new species of the genus *Milnesium* (Tardigrada, Eutardigrada, Milnesiidae). Zootaxa 1122, 1-23. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1122.1.1>

Tůmová, M., Stec, D., Michalczyk, Ł., & Devetter, M. (2022). Buccal tube dimensions and prey preferences in predatory tardigrades. Appl. Soil Ecol., 170, 104303. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104303>

Ugarte, P. D. D. S., Suzuki, L. P., Cruvinel, L. G., & Garraffoni, A. R. S. (2023). Georeferenced database and interactive online map of limnoterrestrial and freshwater Tardigrada from Central and South America. Biota Neotrop., 23(3). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2023-1498>

Ugarte, P. D. D. S., & Garraffoni, A. R. S. (2024). Removal of historical taxonomic bias and its impact on biogeographic analyses: a case study of Neotropical tardigrade fauna. Zool. J. Linn. Soc., 201(3). <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlae091>

Vaidya, G., Lohman, D. J., Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics 27, 171-180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>

Venencia-Sayas, D., Londoño, R., Daza, A., Pertuz, L., Marín-Muñoz, G., Londoño-Mesa, M. H., ... & Quiroga, S. (2023). Tardigrades (Tardigrada) of Colombia: historical overview, distribution, new records, and an updated taxonomic checklist. Diversity, 16(1), 13. <https://doi.org/10.3390/d16010013>

Weglarska, B. (1989). Ultrastructure of tardigrade *Dactylobiotus dispar* (Murray 1907) cuticle. Acta Biol. Cracov. Series Zoologia, 31.

Welnicz, W., Grohme, M. A., Kaczmarek, Ł., Schill, R. O., & Frohme, M. (2011). Anhydrobiosis in tardigrades—the last decade. J. Insect Physiol., 57(5), 577-583. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.019>

Zeller, C. (2010). Untersuchung der Phylogenie von Tardigraden anhand der Genabschnitte 18S rDNA und Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 (COX I). MSc thesis, Technische Hochschule Wildau, 105 pp.

Zhu, A., & Stone, J. (2022). Bearing extremes: impacts from simulated outer space conditions and effective ultraviolet radiation shielding materials on tardigrade life history. *Health Physics*, 123(3), 238-244. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001585>

| ANEXOS

I. Declaração de Direitos Autorais

DECLARAÇÃO

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada “Taxonomia integrativa de uma nova espécie de tardígrado limnoterrestre (gênero *Milnesium* Doyère 1840), a primeira espécie ‘indígena’ amplilocada na América do Sul”, não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28 de fevereiro de 2025.



Assinatura:

Nome da aluna/autora: Emiliana Brotto Guidetti

RG nº 55.562.045-1

Assinatura:



Documento assinado digitalmente
ANDRÉ RINALDO SENNA GARRAFFONI
Data: 27/06/2025 16:30:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Nome do orientador: André Rinaldo Senna Garraffoni

RG nº 24.707.631-4

II. Declaração de Bioética e Biossegurança

DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “Taxonomia integrativa de uma nova espécie de tardígrado limnoterrestre (gênero *Milnesium* Doyère 1840), a primeira espécie ‘indígena’ amplilocada na América do Sul”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos à Biossegurança.

Campinas, 28 de fevereiro de 2025.



Assinatura:

Nome da aluna/autora: Emiliana Brotto Guidetti

RG nº 55.562.045-1

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
 ANDRÉ RINALDO SENNA GARRAFFONI
Data: 27/06/2025 16:29:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Nome do orientador: André Rinaldo Senna Garraffoni

RG nº 24.707.631-4