

ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO Y MÉTODOS DE ESTUDIO DE TARDÍGRADOS (TARDÍGRADA: HETEROTARDÍGRADA, EUTARDÍGRADA), CON NOTAS SOBRE LOS TARDÍGRADOS MUSCÍCOLAS DE CUBA

Rogelio Roberto MUÑOZ LI* y Abdiel JOVER CAPOTE

Departamento de Biología y Geografía, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba, Cuba, CP. 90500

* Autor para correspondencia: rogelio.munoz@estudiantes.uo.edu.cu

RESUMEN: El filo Tardigrada Doyère, 1840 es un grupo de ecdisozoos que poseen un cuerpo dividido en segmentos y provisto de cuatro pares de apéndices locomotores culminados en garras, un aparato bucofaríngeo armado con estiletes y formado por un tubo bucal y una faringe succionadora. Habitan en ambientes tanto acuáticos como terrestres, asociados por lo general a organismos fotosintetizadores como los musgos. El grupo ha sido poco estudiado en Cuba, de hecho, *Echiniscus barbarae* Kaczmarek y Michalczyk, 2002 (Heterotardigrada), descrita para la provincia de Pinar del Río, es la única especie reportada para el país. El propósito de esta investigación fue revisar la bibliografía actualizada sobre el tema, crear una herramienta para el estudio de este filo y realizar los primeros registros de eutardigrados para Cuba y de heterotardigrados para Santiago de Cuba. En este documento, se exponen los métodos para el estudio taxonómico (recolecta, preservación e identificación) de estos organismos y se reportan por primera vez los géneros *Milnesium*, *Mesobiotus* y *Macrobiotus* para Cuba y se amplía la distribución de *Echiniscus* para el oriente del país y se confecciona una clave dicotómica para la identificación de estos taxones.

PALABRAS CLAVE: Antillas, *Echiniscus*, osos de agua, *Macrobiotus*, *Mesobiotus*, *Milnesium*

ABSTRACT: CURRENT STATE OF KNOWLEDGE AND METHODS OF STUDY OF TARDIGRADES (TARDIGRADA: HETEROTARDIGRADA, EUTARDIGRADA), WITH NOTES ON MOSS TARDIGRADES OF CUBA. The phylum Tardigrada Doyère, 1840 is an ecdysozoan group that presents a segmented body with four pairs of locomotors appendices ended in claws, a buccopharyngeal apparatus armed with stylets and made by a buccal tube and a suck pharynx. They inhabit in both, aquatic and terrestrial environments, usually associated to photosynthetic organisms like mosses. This group has been scarcely studied in Cuba, indeed, *Echiniscus barbarae* Kaczmarek and Michalczyk, 2002 (Heterotardigrada), described from Pinar del Río province, is the only known species from Cuba. The aim of this research was review the actual bibliography about the topic, create a tool for the study of this phylum and report the first eutardigrades from Cuba and heterotardigrades from Santiago de Cuba. In this paper, the methods to do taxonomic studies of these organisms are explained (collect, preservation and identification) and for the first

time are reported the genus *Milnesium*, *Mesobiotus* and *Macrobiotus*, the distribution of *Echiniscus* is extended to the Oriental Region. Moreover, a dichotomy key is created for identification of these taxa.

KEYWORDS: *Echiniscus*, *Milnesium*, *Mesobiotus*, *Macrobiotus*, water bears, West Indies.

INTRODUCCIÓN

El filo Tardigrada comprende más de 1 200 especies descritas (Degma *et al.*, 2017). Es un grupo de micrometazoos hidrófilos y protostomados. Estudios moleculares con ARNr 18S lo ubican en el clado Panarthropoda, emparentados filogenéticamente con los artrópodos y onicóforos (Nelson *et al.*, 2015). Su tamaño varía entre 50 y 1 200 µm (Caicedo *et al.*, 2014), aunque se han registrado ejemplares de hasta dos milímetros (Guil 2008). Poseen un cuerpo con simetría bilateral dividido en cinco segmentos no muy bien diferenciados: cefálico, tres segmentos del tronco y uno caudal (León 2018). De manera general poseen forma convexa en la superficie dorsal y aplanados hacia el lado ventral (Nelson *et al.*, 2015), están cubiertos con una cutícula y provistos de cuatro apéndices locomotores terminados en garras variables en número y forma (Ramazzotti y Maucci 1983).

Estos organismos pueden ser encontrados en numerosos hábitats, tanto terrestres como acuáticos (marinos y dulceacuícolas) (Meyer, 2013; Miller y Perry, 2016). Con frecuencia están asociados a la superficie de briófitos, hepáticas, líquenes, algas y otros organismos fotosintetizadores, así como en la hojarasca y el suelo (Rodríguez-Candela *et al.*, 2016).

Una característica peculiar y sorprendente de este grupo, es la capacidad de entrar en un estado de latencia denominado criptobiosis cuando las condiciones del medio son adversas. Esta es la razón por la cual pueden ser muy resistentes a circunstancias tales como temperaturas muy altas o bajas, desecación, falta de oxígeno, estrés osmótico e incluso a condiciones de vacío y a la radiación ionizante del espacio (Caicedo *et al.*, 2014).

Hasta el 2013 solo se habían reportado para el continente americano 380 especies pertenecientes a 54 géneros. De estas, 245 especies han sido recolectadas en el Neártico y 251 en el Neotrópico, 52 son consideradas cosmopolitas, mientras 153 especies solo se conocen de las Américas (Meyer, 2013). En Cuba estos organismos han sido muy poco estudiados, existiendo solo una especie de heterotardigrado registrada para el país: *Echiniscus barbarae* Kaczmarek y Michalczyk 2002, y ninguna de la clase Eutardigrada (Degma *et al.*, 2017), de ahí la importancia de su estudio en este país. En este trabajo se presenta el estado del conocimiento de la diversidad taxonómica del filo Tardigrada en Cuba y se aporta el primer registro de eutardígrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

La recolecta se realizó en el "Jardín de los Helechos de Santiago de Cuba" (20°00'59.76"N - 075°48'59.76"W), Cuba. Se separaron de sustrato rocoso 13 muestras de briófitos con ayuda de una espátula de metal. Estos fueron depositados en sobres de papel para facilitar el secado y almacenamiento (Ramazzotti y Maucci, 1983). Las muestras de briófitos procesadas pertenecían a las especies *Anomodon rostratus* (Hedw.) Schimp, *Fissidens fontanus* (Hedw.) y *Haplodadium microphyllum* (Hedw.) Broth. Estas fueron identificadas por Angel Motito Marín del Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad y depositados en la colección Briofitas del Herbario Jorge Sierra Calzado (BSC). Sobre los briófitos se recolectaron un total de 61 especímenes de tardígrados pertenecientes a las dos clases: Heterotardigrada y Eutardigrada. El material estudiado está depositado en la colección zoológica del Museo de Historia Natural "Charles Teodoro Ramsden de la Torre" (CZCTR) de la Universidad de Oriente.

En el laboratorio las muestras se rehidrataron por un período de 24 horas (Caicedo *et al.*, 2014). Se realizaron inspecciones con un microscopio estereoscópico Novel NSZ-808M para aislar los especímenes de tardígrados con ayuda de una pipeta Pasteur. Estos fueron observados con un microscopio óptico Novel N-800M, utilizando el lente de inmersión para visualizar mejor los caracteres. Las fotografías fueron tomadas con una cámara HDCE-50B acoplada. Los ejemplares fueron identificados según la literatura consultada, basándose de manera primaria en la morfología del aparato buco-faríngeo, la cutícula y las garras (Schuster *et al.*, 1980; Ramazzotti y Maucci, 1983; Bertolani y Rebecchi, 1993; Nelson y Marley, 2000; Tumanov, 2006; Pilato y Binda, 2010; Michalczyk *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2015; León, 2018). Además, de la consulta a Lukasz Kaczmarek de la Adam Mickiewicz University de Polonia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MÉTODOS DE RECOLECTA, FIJACIÓN Y MONTAJE

TARDÍGRADOS MARINOS, DULCEACUÍCOLAS E INTERSTICIALES: Los ejemplares de este tipo de tardígrados viven exclusivamente en el fondo, ya que son incapaces de nadar y necesitan un sustrato para su movimiento. El método de recolecta de estos organismos es el mismo usado para otros grupos de la meiofauna bentónica: arrastrar por

el fondo dragas con mallas de orificios de 50 µm donde queden atrapados los especímenes. Es necesario someterlos a un shock con agua dulce para separarlos del sustrato. Para los tardígrados pertenecientes a la fauna intersticial se suele recolectar agua de un agujero excavado cerca de una masa de agua y luego se tamiza para su estudio (Ramazzotti y Maucci, 1983).

TARDÍGRADOS MUSCÍCOLAS: Se separan del sustrato (líquenes, briófitos o hepáticas) con ayuda de una cuchilla o espátula y se deben introducir en sobres de papel para evitar la humedad y mantener el material el tiempo necesario hasta su procesamiento. Los musgos recolectados en lugares donde el flujo del agua es constante pueden contener tardígrados que carecen de la capacidad de entrar en el estado de criptobiosis, por lo que deben ser guardados en recipientes con agua y procesados de forma rápida. Para la obtención de los ejemplares se debe colocar durante varias horas el material recolectado en placas con agua para rehidratarlos, luego se procede a exprimir el material o puede ser lavado con agua del grifo sobre un tamiz. El agua restante debe ser examinada bajo un estereoscopio (Ramazzotti y Maucci, 1983; León, 2018).

TARDÍGRADOS EDÁFICOS Y DE HOJARASCA: Para recolectar muestras del suelo es necesario utilizar un tubo metálico de bordes afilados, que pueda ser introducido en la tierra y recoger su contenido. Esta técnica es muy útil para realizar estudios cuantitativos, ya que se pueden conocer las dimensiones del tubo utilizado. En este caso el material recogido debe guardarse también en sobres o bolsas de papel. Para los ejemplares que habitan en los estratos más superficiales de hojarasca, desde los cinco hasta los diez centímetros, no se requiere ninguna precaución especial (Ramazzotti y Maucci, 1983).

Los especímenes recolectados en hábitats terrestres y acuáticos pueden fijarse utilizando formalina del cinco al diez por ciento. Para esto se debe neutralizar con carbonato de magnesio para evitar que se dañen las estructuras calcáreas, como garras y estiletes (Ramazzotti y Maucci, 1983). Los tardígrados encontrados en muestras de líquenes, musgos y hepáticas pueden ser fijados con alcohol al 70-80%, también puede ser utilizado el líquido de Carnoy (metanol al 96% y ácido acético puro en proporción de 3:1) (Bertolani *et al.*, 1990).

Los métodos más utilizados para el montaje de los ejemplares son el líquido de Faure (50 cc de agua destilada, 50 g de hidrato de cloral, 20 cc de glicerina y 30 g de goma arábica) o el polivinil lactofenol (Ramazzotti y Maucci, 1983; León, 2018). Las preparaciones con líquido de Faure se conservan durante mucho tiempo, sin embargo, el polivinil lactofenol permite una mejor extensión de los ejemplares y conserva muy bien las estructuras cuticulares (Ramazzotti y Maucci, 1983). Otro de los métodos utilizados es el medio de Hoyer (50 g de agua destilada, 30 g de goma arábica cruda, 150 g de hidrato de cloral, 20 g de glicerina, 1 g de ioduro de potasio y 2 g de yodo), este conserva a los tardígrados transparentes y extendidos, la preparación debe ser sellada (Nelson y Marley, 2000).

SISTEMÁTICA

El filo Tardigrada está subdividido en dos clases (Heterotardigrada y Eutardigrada), cuatro órdenes y 23 familias (Caicedo *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 2015). Los heterotardigrados poseen apéndices cefálicos, cirros y una cutícula engrosada que generalmente se encuentra dividida en placas dorsales, patas armadas por garras complejas y/o discos succionadores (Ramazzotti y Maucci, 1983; León, 2018). Los eutardigrados presentan una cutícula fina y una gran parte de los individuos pueden carecer de órganos sensoriales (Ramazzotti y Maucci, 1983). La identificación de estos metazoos se efectúa sobre la base de caracteres mayormente anatómicos, como la morfología de las garras, forma y estructuración del aparato buco-faríngeo, presencia de estructuras sensoriales, como cirros, papilas o lamelas, labrado de la cutícula y la ornamentación de los huevos (Ramazzotti y Maucci, 1983; Pilato y Binda, 2010; Caicedo *et al.*, 2014).

Existe una tercera clase, Mesotardigrada, hasta ahora compuesta por una única especie, *Thermozodium esakii* Rhanm, 1937, encontrada en Nagasaki, Japón. Los especímenes tipo y la localidad donde fueron registrados desaparecieron producto de un incidente sísmico, por lo que dicha clase es actualmente dudosa (León 2018).

CARACTERES UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

GARRAS: la morfología de las garras es el carácter principal para la identificación hasta el nivel de familia (Nelson y Marley, 2000; Pilato y Binda, 2010; León, 2018), y en algunos casos hasta el nivel de género. Los eutardigrados presentan de manera general cuatro garras en cada pata unidas en dos pares, por lo que se les denomina diplouñas (Fig. 1). Cada diplouña presenta una rama principal que puede poseer dos puntas accesorias, y una rama secundaria más externa sin puntas accesorias (León 2018). La secuencia en la que se muestran las ramas de las garras es importante para la identificación de géneros, ya que en algunos es alternada o asimétrica (2-1-2-1 o secundaria-principal-secundaria-principal) y en otros las dos ramas principales están próximas una de la otra de forma

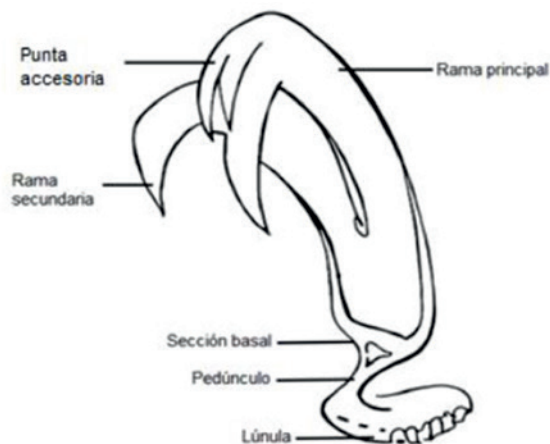


FIGURA 1. Vista general de la estructura de una diplouña (modificado de León 2018).

FIGURE 1. General view of the structure of a diploclaw (modified from León 2018).

simétrica (2-1-1-2 o secundaria-principal-principal-secundaria). Otras estructuras que pueden estar presentes son las lúnulas y bandas cuticulares asociadas a las garras (Nelson y Marley, 2000; Nelson *et al.*, 2015), las lúnulas varían en tamaño y forma, pudiendo ser lisas o dentadas (Ramazzotti y Maucci, 1983; Nelson *et al.*, 2015; León, 2018).

Los eutardigrados pertenecientes a la familia Milnesiidae (Orden Apochela), no poseen verdaderas diplouñas, ya que las ramas principal y secundaria están completamente separadas (Fig. 2, C). En estos ejemplares la rama principal es larga y delgada, mientras que la secundaria es corta, robusta y pueden poseer dos o tres espuelas (Pilato y Binda, 2010; Nelson *et al.*, 2015).

En el orden Parachela las ramas principal y secundaria están conectadas, coincidiendo en una región o tracto basal común, exceptuando al género *Ramajendas* y el tardigrado muscícola *Isohypsibius deflexus* Mihelcic, 1960, en los cuales las ramas de las garras externas no están conectadas. Las familias Macrobiotidae y Murrayidae poseen garras simétricas con la secuencia 2-1-1-2. Los miembros de la familia Macrobiotidae tienen diplouñas en forma de Y o L, con las ramas fusionadas en una región basal. En Murrayidae las garras tienen forma de V y las dos ramas de cada diplouña divergen inmediatamente después del tracto basal. En dos de los géneros de esta familia (*Dactylobiotus* y *Macroversum*) existe un nexo cuticular entre las bases de cada par de garras (Fig. 2 G) (Nelson *et al.* 2015).

Todas las familias restantes de eutardigrados están caracterizadas por garras asimétricas y una secuencia 2-1-2-1. En Calohypsibiidae no existe un tracto basal y puede ser observada una sutura entre las dos ramas, aunque estas se encuentran rígidamente unidas en su base.

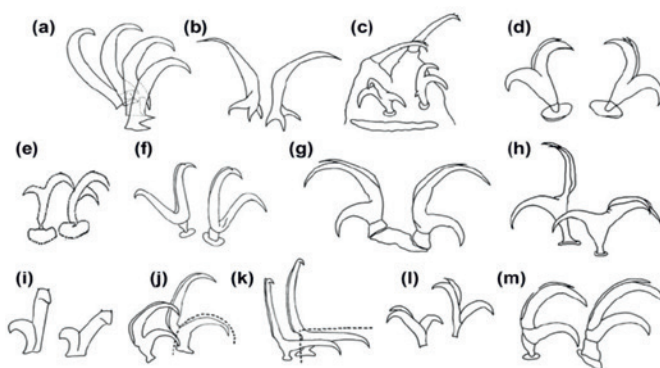


FIGURA 2. Diferentes tipos morfológicos de garras. Heterotardigrada: (a) *Echiniscus*; (b) *Carphania*. Eutardigrada: (c) *Milnesium*; (d) *Macrobiotus*; (e) *Tenuibiotus*; (f) *Murrayon*; (g) *Dactylobiotus*; (h) *Thulinus*; (i) *Calohypsibius*; (j) *Hypsibius*; (k) *Isohypsibius*; (l) *Microhypsibius*; (m) *Bertolanus* (tomada de Nelson *et al.* 2015).

FIGURE 2. Different morphological types of claws. Heterotardigrada: (a) *Echiniscus*; (b) *Carphania*. Eutardigrada: (c) *Milnesium*; (d) *Macrobiotus*; (e) *Tenuibiotus*; (f) *Murrayon*; (g) *Dactylobiotus*; (h) *Thulinus*; (i) *Calohypsibius*; (j) *Hypsibius*; (k) *Isohypsibius*; (l) *Microhypsibius*; (m) *Bertolanus* (from Nelson *et al.* 2015).

Microhypsibiidae posee garras con una estrecha porción basal continua con la rama principal, y la rama secundaria se une rígidamente con la principal. En Eohypsibiidae las garras están compuestas por tres porciones separadas por un septo interno: porción basal, rama principal y rama secundaria, la garra interna puede rotar en su base y similar la secuencia 2-1-1-2. En Isohypsibiidae, la rama secundaria está insertada de forma perpendicular al tracto basal común, las garras internas y externas son similares en tamaño y forma (Fig. 2, K) (Nelson *et al.*, 2015).

En la familia Echiniscidae de la clase Heterotardigrada, cada pata termina en cuatro garras separadas no ramificadas (Fig. 2, A y B) (Nelson y Marley 2000, Nelson *et al.* 2015), en el género *Carphania* de la familia Carphaniidae, los especímenes poseen dos garras en los primeros tres pares de patas (I-III) y solo una reducida en el cuarto par (IV), todas las garras poseen punta accesoria y cuatro espuelas basales (Fig. 2, B). La punta accesoria es una fina estructura cuticular que extiende su porción distal fuera de la garra (Nelson y Marley, 2000; Nelson *et al.*, 2015). En esta clase las garras están dispuestas de forma simétrica al eje de la pata y pueden ser lisas o presentar una espuela a diferentes distancias desde la base de la garra (León 2018).

APARATO BUCOFARÍNGEO: El aparato bucofaringeo consiste en una estructura compleja que consta de un tubo bucal, una faringe succionadora muscular que puede poseer placoides o varas y un par de estiletes punzantes que pueden ser extendidos a través de la abertura de la boca (Fig. 3) (Nelson y Marley, 2000). Esencialmente en eutardígrados el aparato bucofaringeo resulta muy útil en la identificación taxonómica (Nelson y Marley, 2000; Nelson *et al.*, 2015; León, 2018).

Este puede constar de estructuras peribucales, como papilas, lóbulos y lamelas (Pilato y Binda, 2010; León, 2018). En el interior de la cavidad bucal pueden estar presentes filas anteriores y posteriores de dientes cuticulares llamados mucrones (Nelson y Marley, 2000). La presencia y el número de estructuras peribucales son significativas para la identificación a nivel genérico (Nelson *et al.*, 2015; León, 2018). En los tardígrados, excepto *Milnesium*, la pared de la porción anterior del tubo bucal está rodeada ventrolateralmente por una corona bucal compuesta por crestas

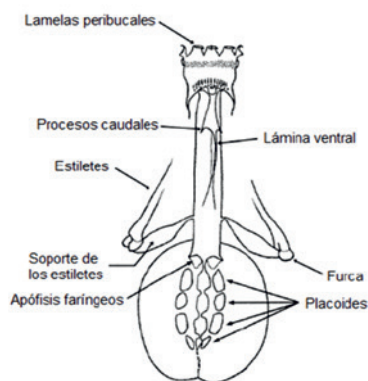


FIGURA 3. Estructura del aparato bucofaringeo de un eutardígrado (modificado de Pilato y Binda 2010).
FIGURE 3. Structure of bucco-pharyngeal apparatus of an eutardigrade (modified from Pilato and Binda 2010).

cuticulares y láminas en las que se insertan los músculos protractores de los estiletes (Nelson *et al.*, 2015).

En eutardígrados los estiletes lucen como dagas que empiezan a engrosarse en la base y a menudo se bifurcan, teniendo unas estructuras llamadas furcas, donde se insertan los soportes de los estiletes. El soporte de los estiletes se presenta como una pequeña vara cuticular elástica y flexible, recta o curva, que se fija al final de la furca en un extremo, y en el otro al tubo bucal (Fig. 3) (Ramazzotti y Maucci 1983).

En algunos géneros de Eutardigrada y algunos heterotardígrados echiniscoideos, el rígido tubo bucal entre el anillo bucal y el soporte de los estiletes, es seguido de un tubo bucal flexible y anillado (Fig. 4, f, g, i-k). Este se extiende desde los soportes de los estiletes hasta el bulbo faríngeo. El tubo faríngeo de los eutardígrados entra en la faringe, terminando a menudo en tres apófisis que funcionan como válvulas. En el interior del bulbo faríngeo pueden encontrarse varias filas de placoides, los anteriores más grandes se denominan macroplacoides y se presentan en dos o tres filas transversas. Los más pequeños y posteriores se denominan microplacoides y pueden estar presentes en una simple fila transversa, estas estructuras son un importante carácter taxonómico (Nelson *et al.*, 2015).

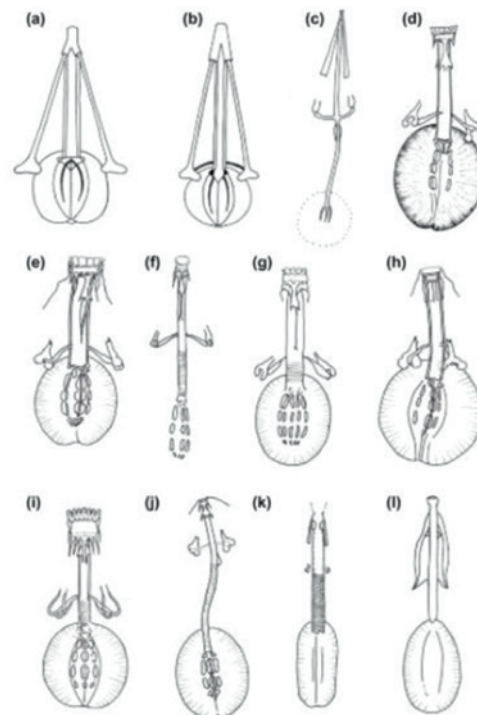


FIGURA 4. Diferentes tipos morfológicos de aparato bucofaringeo. Heterotardigrada: (a) *Echiniscus*; (b) *Pseudoechiniscus*; (c) *Carphania*. Eutardigrada: (d) *Pseudobiotus*; (e) *Macrobiotus*; (f) *Biserovus*; (g) *Insuetifurca*; (h) *Isohypsibius*; (i) *Eohypsibius*; (j) *Diphascon*; (k) *Astatumen*; (l) *Parascon* (tomada de Nelson *et al.* 2015).
FIGURE 4. Different morphological types of bucco-pharyngeal apparatus. Heterotardigrada: (a) *Echiniscus*; (b) *Pseudoechiniscus*; (c) *Carphania*. Eutardigrada: (d) *Pseudobiotus*; (e) *Macrobiotus*; (f) *Biserovus*; (g) *Insuetifurca*; (h) *Isohypsibius*; (i) *Eohypsibius*; (j) *Diphascon*; (k) *Astatumen*; (l) *Parascon* (from Nelson *et al.* 2015).

En la clase Heterotardigrada el soporte de los estiletos puede estar presente o no. La familia Echiniscidae los presenta en ocasiones, pero son muy difíciles de observar. Frecuentemente los estiletos son muy largos y finos, uniéndose directamente a la faringe por una banda muscular (Ramazzotti y Maucci 1983). En lugar de placoides, los integrantes de esta clase poseen varas cuticulares en la faringe (Fig. 5a).

En general los eutardígrados presentan cinco tipos morfológicos principales de aparato bucofaríngeo, basados en los géneros *Macrobiotus*, *Hypsibius*, *Diphascoen*, *Pseudodiphascoen* y *Milnesium*. El aparato tipo *Macrobiotus* presenta un tubo bucal rígido provisto de lamelas y lámina ventral (Fig. 4, e), mientras el tipo *Hypsibius* posee un tubo bucal rígido que carece tanto de lamelas como de lámina ventral (Fig. 4, h, i). El tipo *Diphascoen* posee un tubo bucal rígido en su porción anterior, mientras que es flexible y anillado en la región posterior, también carece de lamelas y lámina ventral (Fig. 4, j). El tipo *Pseudodiphascoen* presenta un tubo bucal similar al tipo *Diphascoen* pero posee lamelas y lámina ventral (Pilato y Binda, 2010).

En el orden Apochela se encuentra el aparato bucofaríngeo tipo *Milnesium*, el cual tiene un tubo bucal relativamente corto y amplio que carece de lámina ventral y posee seis lamelas triangulares (excepto en *Milnesium tetralamelatum* Pilato y Binda 1991), y seis papilas peribucales (Fig. 5b). Los otros aparatos bucofaríngeos observados hasta la fecha son variaciones de los ya mencionados (Nelson y Marley 2000, Pilato y Binda 2010).

CUTÍCULA: Es utilizada a menudo para la identificación de especies y la clasificación en clases, órdenes y géneros (León 2018). Esta es altamente permeable al agua y cubre toda la superficie corporal, es secretada por la hipodermis y consiste en tres membranas ultraestructurales: epicutícula, intracutícula y procutícula, de las cuales la más interna contiene quitina (Nelson *et al.* 2015).

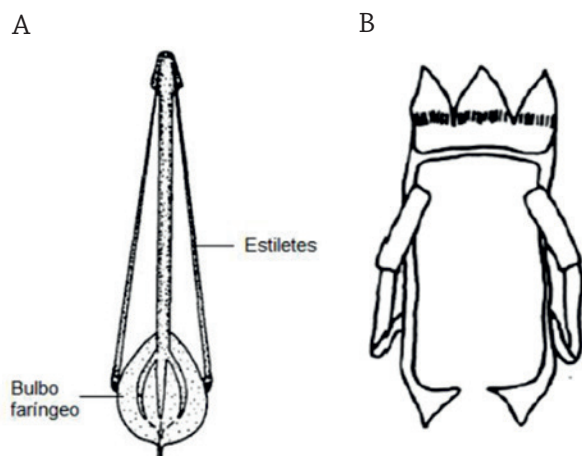


FIGURA 5. A. Aparato bucofaríngeo de un heterotardígrado (modificada de Ramazzotti y Maucci 1983); B. Aparato bucofaríngeo tipo *Milnesium* (modificado de Nelson y Marley 2000).

FIGURE 5. A. Bucco-pharyngeal apparatus of a heterotardigrade (modified from Ramazzotti and Maucci 1983); B. Bucco-pharyngeal apparatus of *Milnesium* type (modified from Nelson and Marley 2000).

Los eutardígrados también llamados tardígrados desnudos, pueden poseer una cutícula lisa, con o sin poros, reticulada, con tubérculos, papilas o espinas (Fig. 6, A). Las tonalidades del cuerpo en algunos tardígrados terrestres pueden variar de blanco hasta café, amarillo, naranja, rosa, rojo, o coloraciones verdosas, debido a pigmentos presentes en células epidérmicas (León 2018).

Los heterotardígrados se diferencian claramente de los eutardígrados por la presencia de placas dorsales (Fig. 6, B), lo que les da el nombre de tardígrados armados. El número de estas y su distribución constituyen un carácter con valor taxonómico para las especies de esta clase. Estas placas se clasifican según su ubicación en la superficie dorsal, pudiéndose diferenciar la placa cefálica, discos segmentados, placas del medio y placas pseudosegmentales.

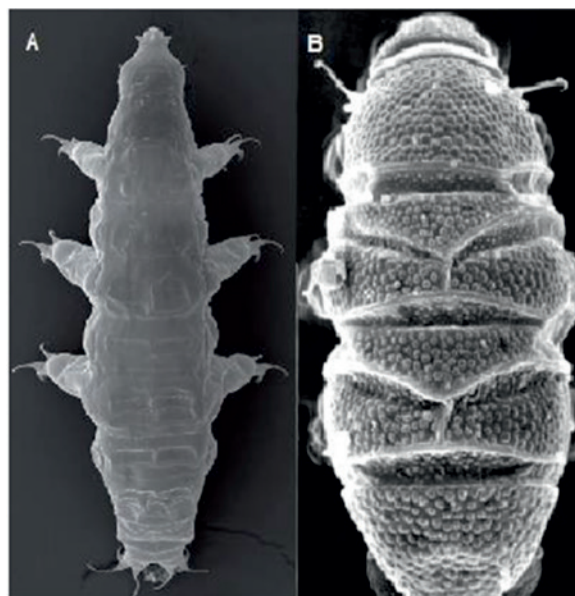


FIGURA 6. (A) Cutícula sin placas dorsales de un eutardígrado (modificado de Morek *et al.*, 2016); (B) Cutícula con placas dorsales de un heterotardígrado (modificado de Kaczmarek y Michalczyk 2002).

FIGURE 6. (A) Cuticle without dorsal plates of an eutardigrades (modified from Morek *et al.*, 2016); (B) Cuticle with dorsal plates of a heterotardigrades (modified from Kaczmarek and Michalczyk 2002).

HUEVOS: Éstos son esenciales para la identificación de especies terrestres y dulceacuícolas, sobre todo en algunos géneros de eutardígrados, donde los ejemplares son morfológicamente similares (Ramazzotti y Maucci 1983, Nelson y Marley 2000, Nelson *et al.*, 2015, León 2018). En tardígrados que habitan en líquenes y musgos los huevos pueden ser encontrados en cualquier época del año, lo mismo aplica para las especies que se encuentran en el suelo, sin embargo, suelen ser más numerosos en invierno (Ramazzotti y Maucci 1983). Los huevos ornamentados son característicos de eutardígrados como *Macrobiotus*, *Murrayon*, *Minibiotus*, *Dactylobiotus*, *Amphibolus*, *Acutuncus*, *Eohypsibius*, *Ramazzottius* y *Hebesuncus*, así como los heterotardígrados del género *Oreella* (Nelson y Marley 2000, Nelson *et al.*, 2015). La ornamentación puede estar compuesta por poros, procesos y reticulaciones o texturas, el patrón es específico para cada especie (Fig. 7) (Bertolani y Rebecchi 1993, Nelson y Marley 2000, Nelson *et al.*, 2015).

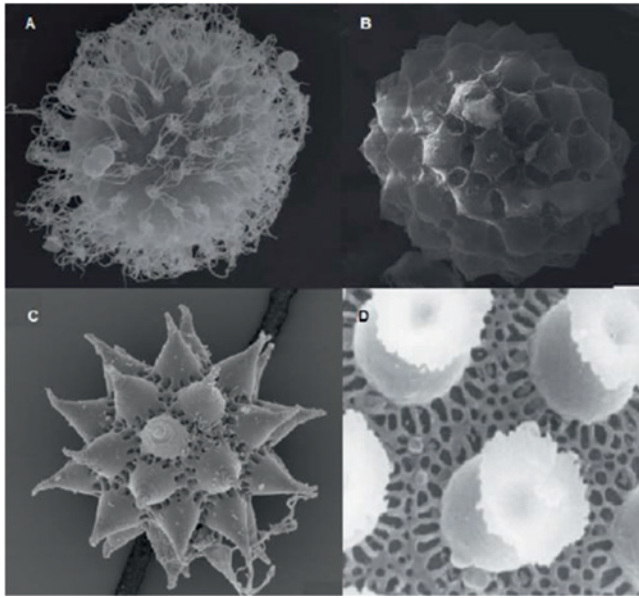


FIGURA 7. Huevos con diferentes ornamentaciones. (A) *Macrobiotus polypiformis* (modificado de Roszkowska *et al.*, 2017); (B) *Mesobiotus hilariae* (modificado de Vecchi *et al.*, 2016); (C) *Paramacrobiotus huziori* (modificado de Kaczmarek *et al.*, 2017); (D) *Macrobiotus vladimiri* (modificado de Bertolani *et al.*, 2011).

FIGURE 7. Eggs with different ornamentations. (A) *Macrobiotus polypiformis* (modified from Roszkowska *et al.*, 2017); (B) *Mesobiotus hilariae* (modified from Vecchi *et al.* 2016); (C) *Paramacrobiotus huziori* (modified from Kaczmarek *et al.*, 2017); (D) *Macrobiotus vladimiri* (modified from Bertolani *et al.*, 2011).

En algunas especies los huevos son ovales y lisos, con una fina pared o escudo; a menudo son depositados en la ecdisis. Estos huevos lisos son característicos de heterotardígrados armados y la mayoría de los eutardígrados de los géneros *Pseudobiotus*, *Doryphoribius*, *Hypsibius*, *Isohypsibius*, *Diphascion*, *Platicrista*, *Itaquascon* y *Milnesium* (Nelson y Marley 2000, Nelson *et al.*, 2015). Ciertos tardígrados muscícolas, como es el caso de Murrayon, depositan los huevos dentro del exoesqueleto de otros organismos (insectos u ostrácodos) (Ramazzotti y Maucci 1983, Nelson *et al.*, 2015), mientras algunas especies de *Isohypsibius* y *Pseudobiotus*, cargan por algún tiempo con la exuvia que contiene los huevos unida al cuerpo (Nelson *et al.*, 2015).

APÉNDICES SENSORIALES: ÉSTOS SON CARACTERÍSTICOS DE LA CLASE Heterotardigrada, mientras que los eutardígrados presentan papilas cefálicas y estructuras peribucales (León 2018), encontrándose estas estructuras solo en representantes de la familia Milnesiidae. En heterotardígrados los apéndices cefálicos incluyen cirros bucales internos, cirros bucales externos, clava y cirros laterales, también conocidos como cirros A (Fig. 8, A) (Nelson *et al.*, 2015, León 2018). Los cirros bucales son proyecciones como filamentos cerca de la boca, el cirro A se sitúa entre la cabeza y la placa escapular. Existen tres tipos de clava: primaria, secundaria y terciaria; estas son cortas y anchas encontrándose entre la placa de la cabeza y la primera placa segmentaria. La clava primaria se encuentra en la placa escapular y las secundarias y terciarias pueden encontrarse en la placa cefálica (León 2018).

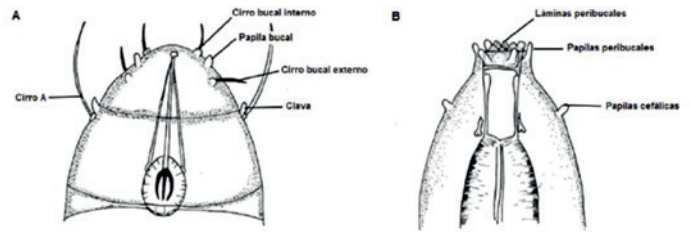


FIGURA 8. Apéndices sensoriales. (A) Heterotardigrada; (B) Eutardigrada (modificado de León 2018).

FIGURE 8. Sensorial appendices. (A) Heterotardigrada; (B) Eutardigrada (modified from León 2018).

En eutardígrados las papilas cefálicas se muestran como proyecciones cuticulares a cada lado de la cabeza (Pilato y Binda 2010, Nelson *et al.*, 2015, León 2018). A su vez, las estructuras peribucales son proyecciones cuticulares que rodean la boca y, dependiendo de su forma, pueden ser papilas, láminas o lamelas (forman un anillo cuticular engrosado rodeando la boca), lóbulos o pápulas (estructuras de perfil inferior que se extienden posteriormente desde el orificio bucal) (Fig. 8, B) (León 2018).

COMPOSICIÓN TAXONÓMICA (PRELIMINAR) DE LOS TARDÍGRADOS DE CUBA

Clave de identificación

1. Tardígrados con cutícula fina, ausencia de cirros. Presentan patas con garras variables en número y forma ____ 2 (CLASE EUTARDIGRADA)

1'. Tardígrados con cutícula engrosada, con placas dorsales. Patas con cuatro garras _____ 4 (CLASE HETEROTARDIGRADA, ORDEN ECHINISCOIDEA, FAMILIA ECHINISCIDAE).

2. Presencia de papilas cefálicas y papilas bucales. Tubo bucal corto y amplio. Ramas principal y secundaria de cada garra completamente separadas. Faringe sin placoides ____ (ORDEN APOCHELA, FAMILIA MILNESIIDAE) *Milnesium* sp.

2'. Ausencia de papilas cefálicas. Ramas principal y secundaria de cada garra unidas en su sección basal formando una diplouña, las dos diplouñas de cada pata similares en tamaño y forma, dispuestas simétricamente al plano medio de la pata (configuración 2112). Tubo bucal con lámina ventral _____ 3 (ORDEN PARACHELA, FAMILIA MACROBIOTIDAE)

3. Faringe con tres macroplacoides dispuestos a lo largo de una línea curva en forma de arco, microplacoide presente claramente cercano (distancia menor que su longitud) al último macroplacoide _____ *Mesobiotus* sp.

3'. Faringe con apófisis, dos macroplacoides en forma de vara, el primero más largo que el segundo con una región media delgada, microplacoide presente ____ *Macrobiotus* sp.

4. Presencia de la placa cefálica, placa escapular, primera placa media sin divisiones, primer par de placas, segunda placa media sin divisiones, segundo par de placas y la placa terminal, tercera placa media ausente. Garras con garras de tipo *Echiniscus* deprovistas de espuelas _____ *Echiniscus* sp.

4'. Placas dorsales bien desarrolladas, placas pareadas divididas en dos porciones desiguales por una línea transversa de pequeños gránulos (1 μ m de diámetro). Tercera placa media

ausente pero el área entre el segundo par de placas y la placa terminal cubierta de gránulos. Placa terminal con un par de incisiones (15 μm de longitud). Garras de tipo *Echiniscus*, pequeñas espinas presentes en el primer par de patas y espuelas en las garras internas de todas las patas _____ *Echiniscus barbarae*

DEFINICIÓN DE LAS CLASES, ÓRDENES Y FAMILIAS DE LOS EJEMPLARES CUBANOS:

CLASE HETEROTARDIGRADA Marcus, 1927: Apéndices cefálicos presentes (incluyendo el cirro "A"). Placoides no separados en la faringe distintos uno de otro, pero con faringe rayada (bandas cuticulares continuas, las cuales son ininterrumpidas) (Ramazzotti y Maucci, 1983).

ORDEN ECHINISCOIDEA Richters, 1926: Las garras son insertadas en una minúscula papila posicionada al final de las patas, las cuales no son digitadas. Cirro medio ausente (Ramazzotti y Maucci, 1983).

FAMILIA ECHINISCIDAE Thulin, 1928: Armadura dorsal compuesta por placas. Patas con cuatro garras (Ramazzotti y Maucci, 1983).

CLASE EUTARDIGRADA Richters, 1926: Carecen de apéndices cefálicos y de cirro "A". Placas dorsales ausentes. Diplouñas diferenciadas en rama principal y secundaria (Ramazzotti y Maucci, 1983).

ORDEN APOCHELA Schuster, Nelson, Grigarick y Christenberry, 1980: Papilas cefálicas presentes. Ramas principal y secundaria de las garras completamente divididas, la rama secundaria es bífida o tripartita. Faringe sin placoides (Ramazzotti y Maucci, 1983).

FAMILIA MILNESIIDAE Ramazzotti, 1962: Eutardígrados con un par de papilas cefálicas y papilas peribucales. Garras con rama principal y secundaria completamente separadas. Presencia de dos modelos de aparato bucofaringeo, el modelo *Milnesium*: Tubo rígido sin lámina ventral, apófisis para la inserción de los músculos de los estiletos muy cortas y muy planas, simétricas con respecto al plano frontal y sin procesos caudales, lamelas peribucales presentes (4 o 6); y el modelo *Limenius*: Tubo subdividido en una porción anterior, corta y rígida (tubo bucal) sin lámina ventral, y una porción posterior larga y flexible (tubo faríngeo) con un engrosamiento espiral, apófisis similares al modelo *Milnesium*, presencia de seis lamelas peribucales (Pilato y Binda, 2010).

ORDEN PARACHELA Schuster, Nelson, Grigarick y Christenberry, 1980: Carecen de papilas cefálicas. Las ramas principal y secundaria de todas las garras conectadas formando una verdadera diplouña (Ramazzotti y Maucci, 1983).

FAMILIA MACROBIOTIDAE Thulin, 1928: Membrana epicuticular compacta, sin estructuras en forma de pilares. Las dos diplouñas de cada pata son similares en tamaño y forma. Diplouñas simétricas con respecto al plano de medio de la pata en configuración 2112 y unidas en una región basal común variable en longitud (forma de Y). En todos los géneros conocidos el tubo bucal es asimétrico con respecto al plano frontal debido a la presencia de una lámina ventral. La porción anterior de la lámina ventral posee dos

procesos caudales apuntando hacia atrás y hacia los laterales (Ramazzotti y Maucci, 1983; Pilato y Binda, 2010).

Descripción de los ejemplares:

Phylum Tardigrada Doyère, 1840
Clase Heterotardigrada Marcus, 1927
Orden Echiniscoidea Richters, 1926
Familia Echiniscidae Thulin, 1928
Género *Echiniscus* Schultze, 1840

Caracteres diagnósticos del género (Ramazzotti y Maucci, 1983):

Presencia de apéndices cefálicos (incluyendo el cirro "A"). Cutícula armada formada por la placa cefálica, placa escapular, primera placa media, primer par de placas, segunda placa media, segundo par de placas, tercera placa media (esta puede estar ausente) y placa terminal. Patas con cuatro garras.

Echiniscus barbarae Kaczmarek y Michalczyk, 2002

Especie endémica reportada para la Sierra de los Órganos en Viñales, provincia de Pinar del Río, Cuba. Tamaño de 190 μm . Color rojo. Manchas oculares ausentes. Cutículas sin poros. Además de los apéndices cefálicos solo el cirro "A" presente. Placas dorsales bien desarrolladas con gránulos redondeados muy visibles. Gránulos variables en tamaño (1-3 μm), mayores en las placas escapular y terminal, especialmente en el centro. Par de placas divididas en dos porciones desiguales por una línea transversa de pequeños gránulos (1 μm de diámetro). Parte anterolateral del par de placas con una pequeña pero distintiva región. Placas medias 1 y 2 bien desarrolladas. Tercera placa media ausente pero el área entre el segundo par de placas y la placa terminal cubierta de gránulos. Placa terminal con un par de incisiones (15 μm de longitud). Garras de tipo *Echiniscus*, pequeñas espinas presentes en el primer par de patas y espuelas en las garras internas de todas las patas.

Echiniscus sp. (Fig. 9)

Caracteres observados: Tamaño promedio de 194 μm . Cutícula armada con placas dorsales, sin poros y con gránulos muy visibles al microscopio óptico. Se observó la presencia de la placa cefálica, placa escapular, primera placa media sin divisiones, primer par de placas, segunda placa media sin divisiones, segundo par de placas y la placa terminal, tercera placa media ausente (Fig. 9, B). Garras de tipo *Echiniscus* desprovistas de espuelas (Fig. 9, C), el último par de patas presenta una franja dentada. Cirrus "A", clavos primarias, par de papilas cefálicas y cirrus bucales externos e internos presentes (Fig. 9, D). Apéndices laterales ausentes. Aparato bucofaringeo tipo *Echiniscus* con un tubo bucal rígido, delgado, sin lámina ventral. Estiletos largos y delgados en forma de daga, soporte de los estiletos ausentes.

Comentarios: Este espécimen pertenece al grupo *Arctomys*, el cual posee varias especies con una confusa posición taxonómica (Kaczmarek y Michalczyk, 2002). Es muy similar a *Echiniscus barbarae*, pero se diferencia de esta especie por no poseer espuelas en ninguna de las garras.

Clase Eutardigrada Richters, 1926
Orden Apochela Schuster, Nelson, Grigarick y Christenberry, 1980

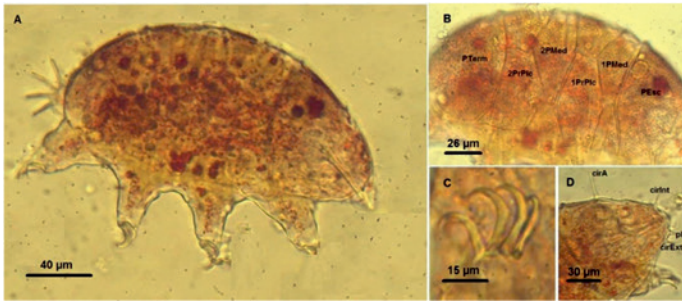


FIGURA 9. *Echiniscus* sp. (A) Hábito; (B) Placas de la cutícula (PEsc: Placa escapular; 1PMed: Primera placa media; 1PrPlc: Primer par de placas; 2PMed: Segunda placa media; 2PrPlc: Segundo par de placas; PTerm: Placa terminal); (C) Garras del primer par de patas; (D) Apéndices sensoriales (cirA: Cirrus "A"; cirExt: Cirrus bucal externo; cirInt: Cirrus bucal Interno; pl: Papilas cefálicas).

FIGURE 9. *Echiniscus* sp. (A) Habit; (B) Dorsal plates (PEsc: Escapular plate; 1PMed: First median plate; 1PrPlc: Firsts paired plates; 2PMed Second median plate; 2PrPlc: Second paired plates; PTerm: Terminal plate); (C) Claws of I pair of legs; (D) Sensorial appendices (cirA: Cirrus "A"; cirExt: Externus buccal cirrus; cirInt Internus buccal cirrus; pl: Cephalic papillas).

Familia Milnesiidae Ramazzotti, 1962

Género *Milnesium* Doyère, 1840

Caracteres diagnósticos del género (Pilato y Binda, 2010): Tardígrados con un par de papilas cefálicas y seis papilas peribucales (excepto en *M. tetralamellatum* Pilato y Binda 1991). Garras de tipo Milnesiidae. Aparato bucofaríngeo modelo *Milnesium* con tubo bucal ancho. Lóbulos peribucales ausentes. Grandes, en su mayoría triangulares, lamelas peribucales presentes (6 o 4). Ausencia de placoides y apófisis en la faringe. Furca de los estiletes de forma triangular. Lúnulas ausentes en las especies conocidas. Huevos lisos depositados en la exuvia.

Milnesium sp. (Fig. 10)

Caracteres observados: Manchas oculares presentes en los ejemplares vivos. Cutícula lisa, sin poros. Presencia de un par de papilas cefálicas y seis papilas peribucales (Fig. 10, B). Aparato bucofaríngeo tipo *Milnesium*, soporte de los estiletes insertados aproximadamente al 66.7% de la longitud del tubo bucal. Garras de tipo *Milnesium*, configuración de las garras [2-3]-[3-2], rama secundaria con un engrosamiento circular basal, puntas accesorias no observadas (Fig. 10, C). Comentarios: Este ejemplar es muy parecido a *M. tardigradum* pero no pudo observarse el punto accesorio en la rama principal de las garras, sin embargo esta es una estructura muy pequeña y en ocasiones muy difícil de ver.

Orden Parachela Schuster, Nelson, Grigarick y Christenberry, 1980

Superfamilia Macrobiotidea Thulin, 1928

Familia Macrobiotidae Thulin, 1928

Género *Mesobiotus* Vecchi, Cesari, Bertolani, Jonsson, Rebecchi y Guidetti, 2016

Caracteres diagnósticos del género (Vecchi *et al.* 2016):

Diplouñas en forma de Y con un tracto común caracterizado por un septo interno que define la parte distal. Cutícula

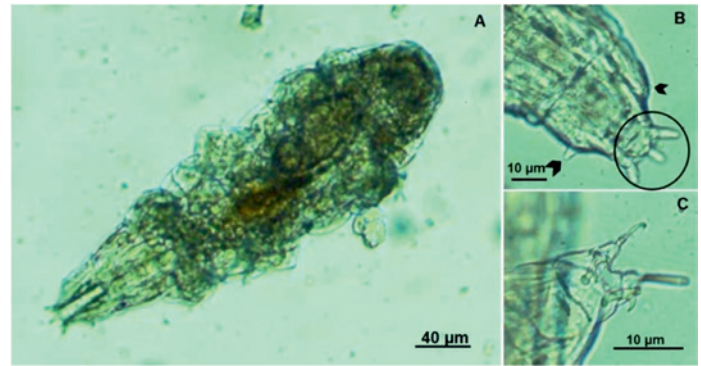


FIGURA 10. *Milnesium* sp. (A) Hábito; (B) Apéndices sensoriales (Cabeza de flecha: Papilas cefálicas; Círculo: Papilas peribucales); (C) Garras del segundo par de patas.

FIGURE 10. *Milnesium* sp. (A) Habit; (B) Sensorial appendices (Arrowhead: Cephalic papillas; Circle: Peribuccal papillas); (C) Claws of II pair of legs.

sin poros. Anillo bucal con 10 lamelas peribucales, tubo bucal rígido. Faringe con tres macroplacoides redondeados dispuestos a lo largo de una línea curva formando un arco, microplacode claramente cercano (distancia menor que su longitud) al último macroplacode. Huevos depositados libremente, caracterizados por procesos cónicos o hemisféricos, generalmente con puntas.

Mesobiotus sp (Fig. 11)

Caracteres observados: Manchas oculares ausentes, cuerpo translúcido. Cutícula lisa, sin poros. Garras en forma de Y, dispuestas simétricamente con respecto al plano frontal de la pata, configuración de las garras [2-1-1-2], rama principal de la diplouña relativamente larga. Lúnulas presentes (Fig. 11, B). Tubo bucal rígido con lámina ventral, anillo bucal con 10 lamelas peribucales, bulbo faríngeo con tres macroplacoides y un microplacode a una distancia menor que su longitud del último macroplacode, disposición de los macroplacoides en forma de arco (Fig. 11, C).

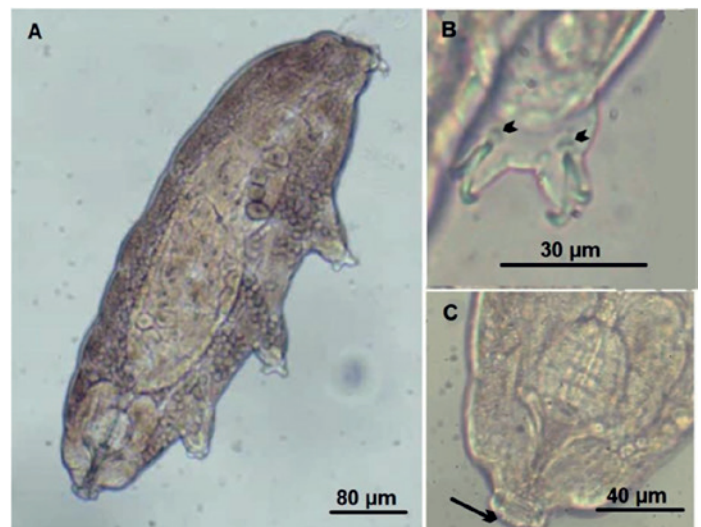


FIGURA 11. *Mesobiotus* sp. (A) Hábito; (B) Garras del primer par de patas (Cabeza de flecha: Lúnulas); (C) Aparato bucofaríngeo (Flecha: lamelas peribucales).

FIGURE 11. *Mesobiotus* sp. (A) Habit; (B) Claws of I pair of legs (Arrowhead: Lunules); (C) Bucco-pharyngeal apparatus (Arrow: Peribuccal lamellas).

Género *Macrobotus* Schultze, 1834

Caracteres diagnósticos del género (Pilato y Binda, 2010): Las dos diploñas de cada pata aproximadamente iguales en tamaño y forma, dispuestas simétricamente con respecto al plano medio de la pata (configuración 2112). Aparato bucofaringeo de tipo *Macrobotus*, variante *Macrobotus*, apófisis y placoides faríngeos presentes. Furca con forma típica. Lúnulas presentes en las especies conocidas. Huevos depositados libres y con procesos.

Macrobotus sp. (Fig. 12)

Caracteres observados: Manchas oculares presentes en los ejemplares vivos. Cutícula lisa. Aparato bucofaringeo de tipo *Macrobotus* con lamelas peribucales y lámina ventral presente (Fig. 12, B). Bulbo faríngeo con apófisis, dos macroplacoides en forma de vara, el primero más largo que el segundo con una región media delgada, y un microplacode. Garras de tipo *Macrobotus*, dispuestas simétricamente con respecto al plano frontal de la pata, con configuración [2-1-1-2] y en forma de Y, coincidiendo la rama principal y la secundaria en una región basal relativamente larga (Fig. 12, C).

Comentarios: Los especímenes encontrados pertenecientes a este género podrían estar dentro del grupo *hufelandi*, por las similitudes morfológicas observadas.

El filo Tardigrada posee una distribución cosmopolita y las investigaciones recientes evidencian un aumento de su representatividad en zonas tropicales. Los investigadores actualizan constantemente el filo a partir de la descripción de nuevas especies, registrándose actualmente 1 265 especies (2 de ellas fósiles) (Degma y Guidetti, 2018). En la medida que se realicen investigaciones y prospecciones en diferentes ecosistemas permitirá conocer la biodiversidad de tardígrados cubanos. La revisión de la literatura y los muestreos exploratorios adicionan cuatro nuevos géneros al phylum Tardigrada para Cuba y se amplía la distribución de *Echiniscus*.

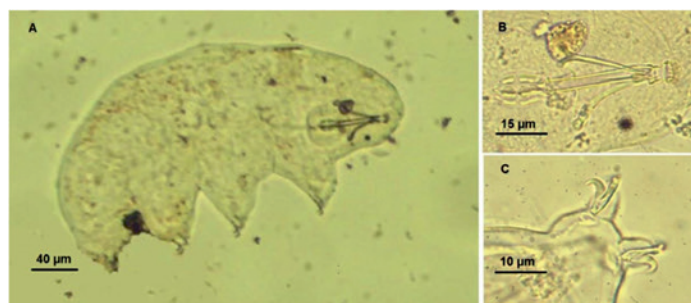


FIGURA 12. *Macrobotus* sp. (A) Hábito; (B) Aparato bucofaringeo; (C) Garras del cuarto par de patas.

FIGURE 12. *Macrobotus* sp. (A) Habit; (B) Bucco-pharyngeal apparatus; (C) Claws of IV pair of legs.

AGRADECIMIENTOS. A los compañeros del Jardín de los Helechos por su excelente atención y colaboración. A Flavia Alvarez Denis y Asiel Cabrera Guerrero, por su apoyo en la recolecta y procesamiento de las muestras. A Alejandro Catalá, por su asistencia en el procesamiento de las imágenes. Agradecimiento especial a Lukasz Kaczmarek de la Adam Mickiewicz University de Polonia por su tiempo y gran ayuda a la identificación de los ejemplares y la bibliografía brindada. A Sigmer Quiroga de la Universidad de Magdalena en Colombia y a dos árbitros por la constructiva revisión de una primera versión del manuscrito.

REFERENCIAS

- Bertolani, R., V. Biserov, L. Rebecchi y M. Cesari. 2011. Taxonomy and biogeography of tardigrades using an integrated approach: new results on species of the *Macrobotus hufelandi* group. *Invertebrate Zoology* 8(1): 23-36.
- Bertolani, R. y L. Rebecchi. 1993. A revision of *Macrobotus hufelandi* group (Tardigrada, Macrobiotidae), with some observation on the taxonomic characters of eutardigrades. *Zoologica Scripta* 22 (2): 127-152.
- Bertolani, R., L. Rebecchi y G. Beccaccioli. 1990. Dispersal of *Ramazzottius* and other tardigrades in relation to type of reproduction. *Invertebrate Reproduction and Development* 18 (3): 153-157.
- Caicedo, M., R. Londoño y S. Quiroga. 2014. Catálogo taxonómico de los ositos de agua (Tardigrada) de la cuenca baja de los ríos Manzanares y Gaira, Santa Marta, Colombia. *Boletín Científico del Museo de Historia Natural de la Universidad de Caldas* 18(1): 197-209.
- Degma, P., R. Bertolani y R. Guidetti. 2017. *Actual checklist of Tardigrada species (2009-2017, 33rd Edition: 15-10-2017)*. Disponible en <http://www.evozoo.unimore.it/site/home/documento1080026927.html>. Último acceso: 1 de marzo de 2018.
- Degma, P y R. Guidetti. 2018. Tardigrade Taxa. Pp. 371-409 En: *Water Bears: The Biology of Tardigrades* (R. O. Schill, Ed.). Zoological Monographs II, Springer Nature Switzerland, Alemania, 419 pp.
- Guil, N. 2008. New records and within-species variability of Iberian tardigrades (Tardigrada), with comments on the species from the *Echiniscus blumi-canadensis* series. *Zootaxa* 1757: 1-30.
- Kaczmarek, L., M. Gawlak, P. Bartels, D. Nelson y M. Roszkowska. 2017. Revision of the genus *Paramacrobotus* Guidetti et al., 2009 with the description of a new species, re-descriptions and a key. *Annales Zoologici* 67 (4): 627-656.
- Kaczmarek, L. y L. Michalczyk. 2002. *Echiniscus barbarae*, a new species of tardigrade from Cuba Island (Tardigrada: Heterotardigrada, Echiniscidae, 'arctomys group'). *Zootaxa* 53: 1-4.
- León, G. 2018. *Taxonomía de Tardígrados (Tardigrada: Eutardigrada: Heterotardigrada) de musgo en localidades selectas del noreste de México*. [Inédito]. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 87 pp.
- Marley, N., S. McInnes y C. Sand. 2011. Phylum Tardigrada: A re-evaluation of Parachela. *Zootaxa* 2819:51-64.
- Meyer, H. 2013. Terrestrial and freshwater Tardigrada of the Americas. *Zootaxa* 3747(1):1-71.
- Michalczyk, L., W. Welnicz, M. Frohme y L. Kaczmarek. 2012. Redescription of three *Milnesium* Doyère, 1840 taxa (Tardigrada: Eutardigrada: Milnesiidae), including the nominal species for the genus. *Zootaxa* 3154: 1-20.
- Miller, W. y E. Perry. 2016. The coastal marine Tardigrada of the Americas. *Zootaxa* 4126 (3): 375-396.
- Morek, W., P. Gasiorek, D. Stec, B. Blagden y L. Michalczyk. 2016. Experimental taxonomy exposes ontogenetic variability and elucidates the taxonomic value of claw configuration in *Milnesium* Doyère, 1840

- (Tardigrada: Eutardigrada: Apochela). *Contributions to Zoology* 85 (2):73-200.
- Nelson, D., R. Guidetti y L. Rebecchi. 2015. Phylum Tardigrada. Pp. 347-380. En: *Ecology and General Biology: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates* (J. Thorp y C. Rogers, Eds.). Academic Press, 1 148 pp.
- Nelson, D. y N. Marley. 2000. The biology and ecology of lotic Tardigrada. *Freshwater Biology* 44: 93-108.
- Pilato, G. y M. Binda. 1991. *Milnesium tetralamellatum*, new species of Milnesiidae from Africa (Eutardigrada). *Tropical Zoology* 4:103-106.
- Pilato, G. y M. Binda. 2010. Definitions of families, subfamilies, genera and subgenera of the Eutardigrada, and keys to their identification. *Zootaxa* 2404:1-54.
- Pilato, G., G. Sabella y O. Lisi. 2016. Two new species of *Milnesium* (Tardigrada: Milnesiidae). *Zootaxa* 4122 (4):575-587.
- Ramazzotti, G. y W. Maucci. 1983. *Il Phylum Tardigrada*. Istituto Italiano di Idrobiologia Verbania Pallanza, Italia, 1014 pp.
- Rodríguez-Candela, M., M. Guil y J. Parapar. 2016. Tardígrados del Parque Natural Fragas do Eume (Galicia, NO España) con la primera cita de *Echiniscus bigranulatus* Richters, 1907 (Tardigrada, Heterotardigrada) en la península ibérica. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Biología)* 110: 61-70.
- Roszkowska, M., M. Ostrowska, D. Stec, K. Janko y L. Kaczmarek. 2017. *Macrobotus polypiformis* sp. nov., a new tardigrade (Macrobotidae; *hufelandi* group) from the Ecuadorian Pacific coast, with remarks on the claw abnormalities in eutardigrades. *European Journal of Taxonomy* 327: 1-19.
- Schuster, R., D. Nelson, A. Grigarick y D. Christenberry. 1980. Systematic criteria of the Eutardigrada. *Transactions of the American Microscopical Society* 99 (3): 284-303.
- Tumanov, D. 2006. Five new species of the genus *Milnesium* (Tardigrada, Eutardigrada, Milnesiidae). *Zootaxa* 1122: 1-23.
- Vecchi, M., M. Cesari, R. Bertolani, K. I. Jönsson, L. Rebecchi y R. Guidetti. 2016. *Corrigendum to: Integrative systematic studies on tardigrades from Antarctica identify new genera and new species within Macrobiotioidea and Echiniscoidea*. *Invertebrate Systematic* 30: 303-322.