



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

Sistemática

DENSIDAD DE VENAS EN HOJAS FÓSILES DE LAS LOCALIDADES MIOCÉNICAS DE SAN ESTEBAN TIZATLÁN, TLAXCALA E IXTAPA, CHIAPAS, MÉTODO PARA SU USO COMO POSIBLE HERRAMIENTA EN LA INTERPRETACIÓN PALEOCLIMÁTICA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

PÉREZ MAUSSÁN ANA ISABEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Laura Calvillo Canadell
Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Carlos Martorell Delgado
Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Oswaldo Téllez Valdés
FES Iztacala

MÉXICO, D.F. Enero, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de octubre de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **PÉREZ MAUSSÁN ANA ISABEL** con número de cuenta **305325776** con la tesis titulada **"Densidad de venas en hojas fósiles de las localidades miocénicas de San Esteban Tizatlán, Tlaxcala e Ixtapa, Chiapas, método para su uso como posible herramienta en la interpretación paleoclimática"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LAURA CALVILLO CANADELL**:

Presidente: DR. YOHAN ALEXANDER CORREA METRIO
Vocal: DRA. JULIETA ALEJANDRA ROSELL GARCÍA
Secretario: DR. CARLOS MARTORELL DELGADO
Suplente: DRA. ALEJANDRA VASCO GUTIÉRREZ
Suplente: DR. OSWALDO TÉLLEZ VALDÉS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de diciembre de 2015.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**)

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), por el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría y de esta tesis (**apoyo 371728**)

Al programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (**PAEP**), por el apoyo económico para la participación en el 4th International Paleontological Congress, en la ciudad de Mendoza, Argentina, en el mes de septiembre del 2014 y por el apoyo en la impresión de esta tesis.

A mi **comité tutorial**, por su participación y guía durante la realización de esta tesis.

Dra. Laura Calvillo Canadell.

Dr. Oswaldo Téllez Valdés.

Dr. Carlos Martorell Delgado

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, por permitirme ser parte de esta institución y realizar mis estudios de posgrado brindándome las bases para seguir adelante.

Al **Instituto de Biología, UNAM**, por permitirme desarrollar este proyecto.

A mi tutora, **Laura Calvillo Canadell** , por todo su tiempo, paciencia, apoyo y sobretodo cariño.

A mi comité tutorial: **Dr. Carlos Martorell Delgado y Dr. Oswaldo Téllez Valdés**, por el tiempo y conocimientos brindados en estos dos años.

Al **comité sinodal** por tomarse el tiempo de leer y corregir este escrito.

Al **Instituto de Geología, UNAM** por el apoyo, en especial al **laboratorio de Paleobotánica** del Instituto de Geología de la UNAM, al **Dr. Sergio Cevallos Feriz** y al **Técnico Enoch Ortiz Motejo** por facilitarme el material que fue básico en la realización de esta tesis.

A **Alejandra Vasco Gutiérrez**, por todo el tiempo, conocimiento y consejos brindados para la conclusión de esta tesis.

A todos los que fueron mis **profesores en el Posgrado de Ciencias Biológicas** por compartir sus experiencias y conocimientos.

A **Daniela Ávila** (Symbion) por todas esas pláticas de desahogo y darme ánimos para terminar esta etapa, gracias por tu amistad.

A **Fabiola Estrada, Christian García, Katia Toxqui y Alejandra Arias** por toda su amistad y apoyo.

A **Ixchel y Aldo** con quienes he compartido toda experiencia del posgrado y con los que he compartido vivencias y conocimientos.

A todos los que de una u otra forma estuvieron conmigo en el desarrollo de esta nueva meta, ¡Muchas Gracias!

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a las personas más importantes en mi vida:

Mis padres Patricia Maussán y David Pérez, porque son el apoyo en todos mis proyectos, por nunca dejarme caer e impulsarme a mejorar cada día, sin ustedes dos ninguno de mis logros habría sido posible. Gracias por todo ese amor incondicional.

Mi hermano Yazir Pérez porque eres un ejemplo a seguir y algunas veces mi confidente y amigo, gracias por todo tu cariño y apoyo.

Mi abuela Isabel Cuevas por todo el amor que me brinda día a día.



El objetivo solo existe en la medida en que un hombre es capaz de soñar con alcanzarlo. Lo que justifica su existencia es el deseo, sin el cual sería una cosa muerta, un sueño distante, una fantasía. Así, del mismo modo que la intención busca su objetivo, el objetivo también busca la intención del hombre, pues es él quien da sentido a su existencia, ya no es sólo una idea, sino el centro del mundo de un arquero. El blanco es el objetivo que hay que alcanzar. Lo escogiste tu, y en eso reside la belleza del camino. No puedes disculparte diciendo que el adversario era más fuerte, pues fuiste tú quien escogiste el blanco, y tuya es la responsabilidad. Si ves en el camino a un enemigo, puede que aciertes el tiro, pero no te mejorarás en nada a ti mismo. Te pasarás la vida simplemente intentando colocar una flecha en el centro de una cosa de papel o madera, algo completamente inútil. Y cuando estés con otras personas te quejarás de que no hiciste nada interesante. Por eso, tienes que escoger tu objetivo, dar lo mejor de ti para alcanzarlo, tratándolo con respeto y dignidad, tienes que saber que significa y cuánto esfuerzo, entrenamiento e intuición te ha exigido. Al mirar al blanco no te concentres en él, mira todo lo que sucede a tu alrededor, porque la flecha, al ser disparada, se encontrará con factores con los que no has contado, como el viento, el peso y la distancia, pero si hiciste los movimientos correctos, da los pasos necesarios y acepta el rezo, abre la mano y suelta la cuerda. Aunque no des en el blanco, sabrás afinar la puntería la próxima vez, si no te arriesgas no sabrás que cambios son necesarios.

Paulo Coelho

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Diferencias entre la LVD del borde y la LVD del centro de la lámina.....	25
Tabla 2. Kruskal-Wallis obtenidas de las LVD de las 25 hojas actuales usando las diferentes áreas muestreadas.....	27
Tabla 3. Comparación de la LVD de hojas fósiles y actuales.....	35
Fig. 1. Corte anatómico de una hoja.....	4
Fig. 2. Tipos de venación.....	5
Fig. 3. Órdenes de venación.....	6
Fig. 4. Imágenes binarias (thresholding).....	12
Fig. 5. Thresholding en imágenes actuales.....	14
Fig. 6. Marcado de hojas en capas.....	15
Fig. 7. Ejemplo de las áreas de zonas de medición.....	16
Fig. 8. Ejemplo de las áreas del análisis de borde.....	17
Fig. 9. Áreas usadas en el análisis de áreas.....	18
Fig. 10. Ejemplos de imágenes usadas en el análisis de órdenes de venación.....	19
Fig. 11. Eliminación de ruido.....	20
Fig. 12. Ixtapa, Chiapas.....	21
Fig. 13. San Esteban Tizatlán, Tlaxcala.....	21
Fig. 14. Reconstrucción de las localidades fosilíferas, San Esteban Tizatlán e Ixtapa.....	21
Fig. 15. Marcado de venas en hojas fósiles.....	22

Fig. 16. Hojas fósiles identificadas por Domínguez de la Torre (2013).....	23
Fig. 17. Hojas aclaradas de <i>Zigya konzattii</i> y <i>Pithecellobium pachipus</i>	23
Fig. 18. Gráfica comparativas de las LVD de los tipos de marcaje.....	24
Fig. 19. Gráfica comparativa de las LVD de las zonas de medición.....	25
Fig. 20. Gráfica comparativa de las LVD del centro y borde de la lámina.....	26
Fig. 21. Gráficas por especie de las LVD obtenidas en cada tamaño de área muestreada.....	28
Fig. 22. Gráfica comparativa de las LVD del análisis de órdenes de venación.....	33
Fig. 23. Gráfica comparativa de las LVD obtenidas del análisis de ruido.....	33
Fig. 24. Gráfica comparativa de las LVD obtenidas del análisis de marcaje en fósiles.....	34
Fig. 25. Gráfica comparativa de las LVD obtenidas en el análisis de ruido en fósiles.....	34
Fig. 26. Gráfica comparativa de las LVD de las hojas de ambas localidades fosilíferas.....	35
Fig. 27. Ejemplo de imágenes de hojas fósiles después del thresholding.....	39

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Marco teórico.....	4
2.1. Arquitectura foliar	4
2.2. Densidad de venas (LVD)	6
2.3. Estudios paleoclimáticos	8
2.4. Análisis digital de imágenes	10
2.5. Medición de LVD a partir de imágenes digitales.....	11
3. Planteamiento del problema	13
4. Objetivos	13
5. Métodos	14
5.1. Marcado de diferentes tipos de imágenes	15
5.2. Análisis de tipo de marcaje	16
5.3. Análisis de zona de medición y análisis de borde.....	16
5.4. Análisis de área	17
5.5. Análisis de altos órdenes de venación	19
5.6. Análisis de ruido	19
5.7. Análisis con hojas fósiles	20
5.8. Análisis de tipos de marcaje en fósiles	22
5.9. Análisis de ruido en fósiles	22
5.10. Comparación de LVD de hojas actuales y fósiles	22
5.11. Comparación de la LVD de ambas localidades fosilíferas	23
6. Resultados	24

6.1. Análisis de tipo de marcaje	24
6.2. Análisis de zona de medición	25
6.3. Análisis de área	27
6.4. Análisis de altos órdenes de venación	33
6.5. Análisis de ruido	33
6.6. Análisis de tipos de marcaje en fósiles	34
6.7. Análisis de ruido en fósiles	34
6.8. Comparación de la LVD de hojas actuales y fósiles	35
6.9. Comparación de la LVD de ambas localidades fosilíferas	35
7. Discusión	36
7.1. Análisis de tipos de marcaje	36
7.2. Análisis de zona de medición	36
7.3. Análisis de área	37
7.4. Análisis de altos órdenes de venación	37
7.5. Análisis de ruido	38
7.6. Análisis de tipos de marcado en fósiles	38
7.7. Análisis de ruido en fósiles	39
7.8. Comparación de LVD de hojas actuales y fósiles	40
7.9. Metodología para medir LVD en hojas fósiles.....	41
7.10. Comparación de la LVD de ambas localidades fosilíferas	41
8. Conclusión	43
9. Literatura citada	45
10. Anexos	52

RESUMEN

La densidad de venas de las hojas (LVD) se define como el largo total del tejido vascular (mm) por unidad de área (mm^2). En los últimos años, el uso de este carácter se ha difundido por su respuesta y adaptación a diferentes condiciones ambientales. Lo anterior hace que la LVD en hojas fósiles tenga potencial para ser usada como proxie en las predicciones de paleoclimas. Uno de los principales obstáculos en el estudio de la LVD, es que son pocas las publicaciones que muestran una metodología explícita para el análisis y medición de este carácter en hojas actuales y son menos los trabajos en hojas fósiles. Es por eso que en este trabajo se cuantificó la LVD de hojas de 25 especies de plantas actuales usando diferentes técnicas y parámetros, haciendo uso del software Leaf Gui, estudiando el efecto de factores que pueden afectar la medición de LVD. Los análisis se enfocaron en estudiar la zona y tamaño más propicios para muestrear el área de la lámina óptima, la necesidad de realizar limpieza de ésta y el tipo de imágenes que son más útiles para las mediciones de la LVD. Con la metodología establecida a partir de las hojas actuales, se evaluó la LVD de 100 hojas fósiles, contrastando los valores obtenidos y seleccionando los parámetros que mostraron medidas con menor error. Se proponen una serie de requisitos para obtener LVD en hojas fósiles. Éstos requisitos son: realizar el marcado de las venas, la eliminación de ruido en la imagen, la obtención de muestras preferentemente lejanas al borde de la lámina y un área mínima de 0.8 cm^2 . Finalmente, se logró medir de forma homogénea la LVD de hojas fósiles provenientes de dos localidades miocénicas, para compararlas con la LVD de hojas actuales y así probar el potencial de este carácter como proxie paleoclimático. En cuanto a la comparación de la LVD de hojas fósiles de ambas localidades, contrario a lo esperado, no se encontraron diferencias significativas que estuvieran acordes con las diferencias de temperatura media anual calculada en estudios previos para las localidades. Esta falta de concordancia lleva a pensar que la LVD no está directamente determinada por la temperatura, pero sí puede estarlo por la precipitación. Otra posibilidad es que el método con el que se han calculado estos climas (CLAMP) no son lo suficientemente robustos. Con la metodología que se propone en este trabajo, se establecen las bases para que se realicen estudios posteriores con un enfoque más claro en la relación LVD y paleoclimas, de manera homogénea en hojas actuales y fósiles.

ABSTRACT.

Leaf vein density (LVD) is defined as the total length of the vascular tissue (mm) per area (mm^2). During the last years, the use of this character has increased because of its response and adaptation to different environmental conditions. This gives the fossil LVD the potential to be used as proxie in paleoclimate predictions. One of the main obstacles in the study of the LVD, is that there are few publications showing an explicit methodology for measuring and analyzing this character in extant species leaves. Moreover, there are even fewer studies using fossil leaves. In this paper we quantify the LVD of 25 leaves from different extant species of plants with different techniques and parameters, using the software the Leaf Gui, to study their effect on the measurement of the LVD. The analysis focused on studying the area and the size of the lamina most favorable to sample. Also the analyses evaluated the need of cleaning the leaf images and the type of images that are more useful for the LVD measurements. With the established methodology from extant leaves, we evaluated the LVD of 100 fossil leaves, contrasting the values obtained, and selecting the parameters where the measurements showed less error. The requirements that are proposed for measuring the LVD of fossil leaves are: to mark all the veins, to remove the image noise, to obtain the sample preferably from the distant edge of the lamina and to sample a minimum area of 0.8 cm^2 . Finally, the LVD of fossil leaves from two Miocene localities was measured to compare them with the LVD of extant leaves and to test the potential of this character as a paleoclimatic proxie. Contrary to expectations the LVD of the leaves from the two fossil locations did not show any significant differences which were consistent with differences on the mean annual temperature calculated for the localities. This inconsistency suggests that the LVD is not directly determined by the temperature, but that can be related whit the precipitation. Another possibility is that the method by which these climates have been calculated (CLAMP) is not sufficiently robust. The methodology proposed in this work, laid the foundations for subsequent studies on the LVD and the paleoclimates relationship. So that this type of studies can be perform in an uniform way for fossil and extant leaves.

1. INTRODUCCIÓN

En paleobotánica, las hojas fósiles que muestran patrones de venación son ampliamente utilizadas en la identificación de taxones fósiles (Boyce, 2008). Este registro aporta evidencia directa de la vida pasada como la edad mínima conocida de la existencia de un grupo determinado y la historia biogeográfica de los linajes (Manchester y Tiffney, 2001).

Debido a la importancia de los patrones de venación en las clasificaciones sistemáticas, se ha prestado mucha atención a las propiedades arquitectónicas de la venación de la hoja, pero pocas investigaciones tratan de las propiedades funcionales de este sistema (Uhl y Mosbrugger, 1998). Apenas durante el siglo XX, Schlotheim y Brongniart comenzaron a usar los caracteres de hojas fósiles como herramientas para reconstruir paleoclimas y paleoambientes en la interacción planta-atmósfera (Chaloner y Creber, 1990).

Uno de los intereses de realizar reconstrucciones paleoclimáticas radica en que el estudio del cambio climático a través de la historia del planeta ayuda a la comprensión del efecto que ha tenido este fenómeno global en la biodiversidad. Para poder comprender este cambio climático se requieren datos que abarquen largos periodos de tiempo y que permitan calibrar modelos de cambio a futuro, con el fin de establecer los efectos que se puedan esperar (Ballesteros-Barrera *et al.*, 2011).

Un carácter que puede ser útil en la interpretación de paleoclimas y paleoambientes es la densidad de venas (LVD). Ésta es una característica de la hoja que cuantifica la cantidad de venación foliar, expresada como la longitud de venas por unidad de área. Recientemente, el uso de las densidades de venas se ha difundido, debido a que este atributo difiere, tanto a nivel individual como de especie, según las características del ambiente en el que se encuentra la planta (Roth-Nebelsick *et al.*, 2001; Blonder y Enquist 2014).

De los principales obstáculos a los que nos enfrentamos para el uso de LVD, es que hay pocas publicaciones que hablan de una metodología detallada para esta medición. (Uhl y Mosbrugger, 1999; Brodribb y Jordan, 2007; Boyce *et al.*, 2009; Dhondt *et al.*, 2011; Feild *et al.*, 2011; Price, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Carnis *et al.*, 2014; Price *et al.*, 2014). Cuando se trabajan hojas fósiles, estas metodologías no han sido bien adaptadas ya que es casi imposible tener las láminas completamente conservadas dificultando la inferencia de la parte de la hoja que se trabaja. Por ello, si se quiere usar este carácter para la deducción de paleoclimas es necesario crear una metodología que permita medir LVD de una forma homogénea entre fósiles y taxones actuales. A su vez adaptar la metodología a las limitaciones con las que nos enfrentamos al trabajar con hojas fósiles.

En este trabajo, se cuantificó la LVD en hojas de 25 especies de plantas actuales (Anexo 2) usando diferentes técnicas y parámetros para proponer una metodología para la medición de este rasgo. Con la metodología establecida, se evaluó la LVD de 100 hojas fósiles, contrastándola con los valores obtenidos en hojas actuales, seleccionando los parámetros que mostraron medidas con menor error. Finalmente, se midieron de forma homogénea las LVD de hojas fósiles provenientes de dos localidades miocénicas y así compararlas, con la finalidad de probar el potencial de este carácter como proxy paleoclimático.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Arquitectura foliar

La hoja es la principal estructura donde se lleva a cabo la mayor parte de la producción primaria de las plantas terrestres. Estas estructuras varían en forma, composición, color y patrón de la venación. El análisis de la hoja es de interés particular porque permite formular hipótesis acerca del cambio de tasas fisiológicas y la temprana diversificación de las plantas terrestres (Das *et al.*, 2014).

Una vena como tal es un haz vascular. Al centro de este haz hay dos tipos de células. El xilema, que transporta agua de las raíces a los tejidos en dirección a las hojas, y el floema, en el que viajan los productos sintetizados químicamente en la hoja y fluye en dirección opuesta al xilema, desde las hojas hacia el resto de la planta (Fig. 1).

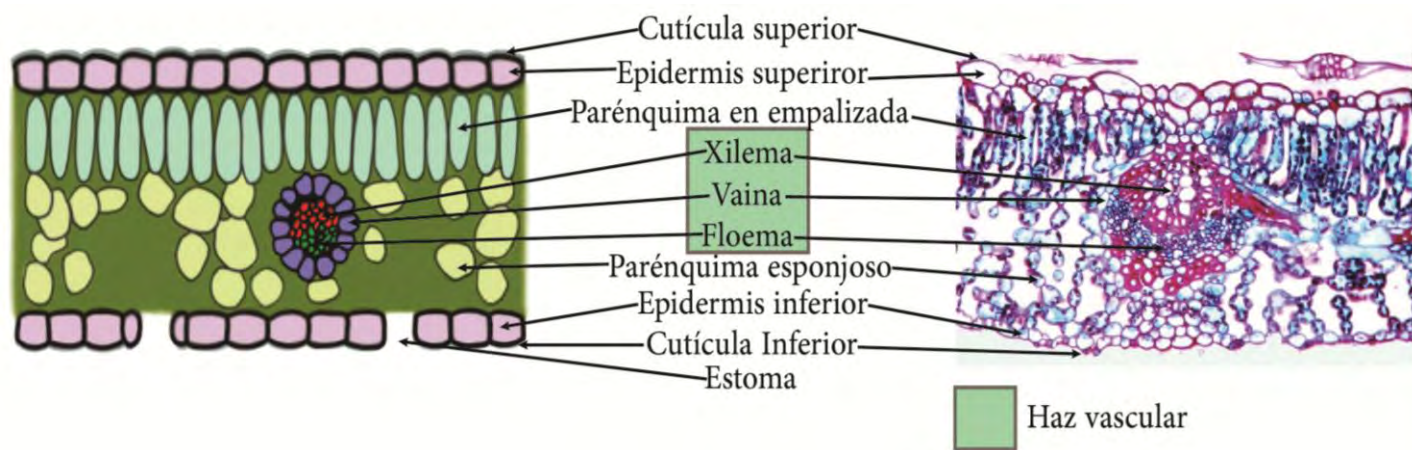


Fig. 1: Corte anatómico de una hoja
(Modificado de <http://biologiaicp2013.blogspot.mx/> y <http://mazinger.sisib.uchile.cl>).

En conjunto, la venación de las hojas se puede definir como una estructura ramificada de dos dimensiones (Roth-Nebelsick *et al.*, 2001). La venación forma una red jerárquica que corresponde al orden temporal en el que se formaron las venas durante el desarrollo de la hoja (Bohn *et al.*, 2002). Los sistemas de venación de la hoja varían de forma importante en los linajes de plantas. Las variaciones en las ramificaciones de las venas son una muestra de la diversidad del grupo de plantas al que pueden pertenecer. Comenzando desde los sistemas abiertos (Fig. 2A), pasando por las venas que muestran un patrón de tipo rejilla característico en las monocotiledóneas (Fig. 2B), hasta una gran variedad de sistemas ramificados en las dicotiledóneas (Fig. 2C) (Sack *et al.*, 2008; Sack y Scoffoni, 2013). La arquitectura de las venas mantiene las mismas funciones en todas las especies de plantas. El soporte mecánico, el transporte de hormonas y azúcares y el reemplazo de agua perdida en la transpiración durante la fotosíntesis son algunos ejemplos (Scoffoni *et al.*, 2011).

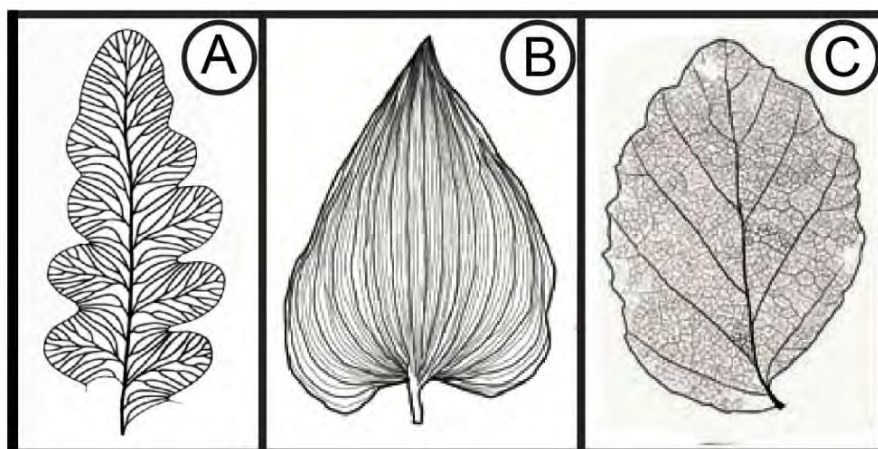


Fig. 2: Tipos de venación. A. Venación abierta típica de linajes tempranamente diversificados (Tomada de Roth-Nebelsick, 2001); B. Venación típica de las monocotiledónias (Modificado de Ellis *et al.*, 2009); C. Venación típica de las dicotiledóneas.

El sistema de venación típicamente consiste en tres órdenes de venas menores y un grupo de aproximadamente cinco órdenes de venas mayores (Scoffoni y Lawren, 2013). Las venas de menor orden suelen ser más grandes en diámetro con células del xilema mayores en tamaño y número (Scoffoni y Lawren, 2013). En general, la vena primaria o vena media es la más larga y vieja. Las secundarias crecen hacia el borde de la hoja, alejándose de la vena media. Siendo estos dos primeros órdenes los responsables del transporte de los fluidos a larga distancia dentro de la hoja y del reforzamiento mecánico de la misma (McKown y Dengler, 2009). Las venas de tercer orden se observan entre las venas secundarias, y de ellas parten las de altos órdenes de venación. Estas venas de altos órdenes se vuelven más pequeñas y delgadas conforme el orden aumenta. Las vénulas

corresponden al orden de venación más alto y se consideran venas abiertas ya que pueden terminar al centro de las areolas cuando estas estructuras están presentes. Las areolas se definen como una estructura reticulada de la venación que se caracteriza por la unión de forma poligonal de venas de altos órdenes (Bohn *et al.*, 2002). Se ha observado que esos altos órdenes de venación poseen una mayor longitud por área, y actúan como una red de distribución. Una mayor densidad aumenta la conductancia al proveer una mayor superficie donde transferir agua al mesófilo (Sack *et al.*, 2008) (Fig. 3).



Fig. 3: Órdenes de venación.

Además del control genético durante el desarrollo de la hoja, el patrón de venación es el resultado del equilibrio entre el transporte y el costo de construir la hoja. Las diferentes geometrías de venación se deben adaptar a diversos ambientes hidráulicos. Los caracteres vasculares pueden influenciar todo el potencial hídrico de la planta dado que el aporte hidráulico influye en la tasa fotosintética y la pérdida de agua por área (Blonder y Enquist, 2014). Es por eso que los caracteres de la hoja se pueden adaptar a diferentes ambientes y pueden ser útiles para estimar el funcionamiento de las plantas del pasado y paleoambientes a partir de hojas fósiles. (McKown *et al.*, 2010).

2.2. Densidad de venas (LVD)

La densidad de venas o LVD (por sus siglas en inglés, Leaf Vein Density) se define como el largo total del tejido vascular por unidad de área laminar medida (Brodribb y Jordan, 2011; Rolland-Lagan *et al.*, 2009 y Price *et al.*, 2011). Existen estudios que muestran que esta densidad no es dependiente del tamaño de la lámina (Uhl y Mosbrugger 1999). Se ha observado que las especies varían ampliamente en la LVD de algunos órdenes de venas (Scoffoni *et al.*, 2011) encontrando fuerte relación con las tasas fotosintéticas, conductancia hidráulica y alometría de la hoja. Por ello, la LVD se usa como un buen predictor de tasas fotosintéticas (Price *et al.*, 2014).

La venación de la hoja pudo haber influenciado la diversificación de las angiospermas (Boyce y Zwieniecki, 2012; Seyfullah, 2012). Se ha visto que a pesar de los cambios en el clima y la composición de la atmósfera, la LVD de las plantas no-angiospermas, como los helechos y las coníferas, se ha mantenido baja y estable por los últimos 380 millones de años (Boyce *et al.*, 2009; Boyce y Zwieniecki, 2012). En comparación, las angiospermas, experimentaron un aumento en la LVD que pudo haber contribuido a la diversificación de linajes y dominancia ecológica de las mismas (Price *et al.*, 2014). Estableciendo en las angiospermas una venación promedio cercana a 2 mm/mm² durante el Paleozoico (Boyce, 2008), subiendo a un promedio de 12 mm/mm² en hojas actuales de regiones tropicales y subtropicales (Boyce, 2009). Ese aumento en los valores de LVD pudo deberse a un decaimiento en el CO₂ ambiental, llevando a mayores aperturas estomáticas, lo que mejoró el rendimiento fotosintético de la planta (Boyce y Zwieniecki, 2012).

Existen diversos factores ambientales que pueden influenciar la LVD como son la velocidad del viento, la humedad del suelo, la cantidad de luz y la presencia de nutrientes. Siendo los patrones de las venas de órdenes menores los que muestran una relación más cercana con las variables ambientales (Zhu *et al.*, 2012; Carnis *et al.*, 2014). Por ejemplo, un estudio realizado con hojas de *Vitis vinifera* (L.), demuestra que una LVD mayor es desarrollada en climas fríos (Pagano y Storchi, 2015). Hojas grandes con baja LVD son resultado de la adaptación a condiciones de baja irradiación y baja demanda transpiracional, mientras que hojas pequeñas con alta LVD son producto de adaptación a ambientes con alta irradiación y altas demandas transpiracionales (Boyce, 2009). Las hojas de sol y sombra no solo difieren de forma marcada en cuanto al tamaño de la hoja, sino también en cuanto a la LVD. Las hojas de sol tienen una LVD mayor que las de sombra, aunque algunas veces se encuentra una relación débil o contradictoria (Blonder y Enquist, 2014).

El parámetro que influye mayormente en la LVD es la disponibilidad de agua. La LVD es menor en plantas de ambientes secos que en plantas de lugares húmedos. Una alta LVD corresponde a un bajo número de células epidérmicas y del mesófilo entre venas. En términos de movimiento de agua en una hoja, una mayor LVD significa desplazar fluidos a distancias de mesófilo menores, facilitando el flujo de agua a través de la hoja (Zhu *et al.*, 2012). Lo anterior, puede conllevar a una alta eficiencia de transporte de agua, mayor densidad y conductividad estomática y altos grados de cambio de gas por unidad de área (Sack y Scoffoni, 2013). Actualmente se apunta a que largas distancias de conducción hidráulica, que corresponden a una baja LVD, se asocian a tiempos de viaje mayores, lo que lleva a una disminución en las tasas fisiológicas de la hoja. Las distancias más cortas de conducción de agua, que

corresponden a altas densidades de venación, se asocian con tasas fisiológicas más altas (Zhu *et al.*, 2012). Es por eso que muchos autores mencionan que la venación de la hoja puede llegar a ser una herramienta útil en paleoclimatología, usándola como proxie ambiental en estudios paleoecológicos y paleoclimáticos. Sin embargo, hay que tener en cuenta la dependencia del tamaño de la hoja en la medición. Todavía no hay una correlación universalmente válida entre la LVD y los parámetros ambientales, debido a que no existen estudios detallados en este campo (Roth-Nebelsick *et al.*, 2001). Si bien existe alto potencial en el uso de este carácter como proxie paleoambiental y paleoclimático, no ha sido bien fundamentado (Uhl y Mosbrugger 1999).

2.3. Estudios paleoclimáticos

Para entender la historia de la Tierra, es importante conocer qué clima existía en cada tiempo y cómo éste fue cambiando hasta la actualidad. El estudio del registro fósil puede ayudarnos a reconstruir la anatomía, comportamiento y evolución de organismos extintos. Además, los fósiles son fuente importante de información para aprender más de los paleoclimas y ambientes del pasado. Las razones principales por las que los paleontólogos se interesan en calcular los paleoclimas son porque los depósitos de carbón y otras formaciones geológicas importantes se controlan climáticamente en el tiempo y el espacio (Greenwood, 2007). Además de que las estimaciones climáticas también son importantes para entender la evolución de los organismos en una biósfera física (Wilf, 1997).

El estudio de las diferentes estructuras de las plantas fósiles han sido las principales contribuyentes para las reconstrucciones paleoclimáticas. La idea de usar plantas fósiles como indicadores paleoclimáticos tienen una larga historia desde el inicio de la paleobotánica y ha recibido atención especial como clave para comprender las condiciones climáticas pasadas (Wilf, 2008).

Los rasgos de las plantas se determinan por la combinación de la herencia genética (genotipo) y la capacidad de responder a los cambios ambientales (fenotipo). Se ha puesto mucha atención en entender los roles relativos del genotipo y su expresión regulada por el ambiente, reflejados en una amplia colección de caracteres de la hoja, en parte para ayudar a entender cómo responden las plantas a cambios climáticos globales (Royer *et al.*, 2009).

En las plantas actuales al igual que en las fósiles, las hojas son las estructuras más abundantes. Éstas normalmente son encontradas por separado del resto de la planta, en algunos casos cubiertas con una fina capa de carbón (Wilf, 2008). Se ha demostrado que la fisionomía de la hoja responde a múltiples factores ambientales (Greenwood, 2007), donde la relación planta/atmósfera juega un papel

importante en la determinación de la morfología de la lámina (Boyce, 2008). Es por ello que los paleobotánicos han ido más allá de la comparación de las características de la hoja en las identificaciones y las han usado cada vez más en cuestiones de interpretaciones ambientales (Hickey, 1973; Royer *et al.*, 2009). Debido a que las hojas fósiles son de difícil identificación, es muy importante señalar que la paleotemperatura puede ser inferida a partir de floras fósiles sin información sistemática precisa (Little *et al.*, 2010).

Para la obtención de información paleoclimática y paleoambiental con base en el estudio de las plantas, se han usado diferentes metodologías. Aunque cada día es menos aceptado, el primer y más común acercamiento al cálculo de los climas del pasado es la comparación con taxones actuales. En ésta, se parte de un actualismo biológico de los requerimientos climáticos y ambientales de los taxones. Para dar una aproximación, se toma como fundamento la extrapolación de la tolerancia climática de cada taxón de plantas actuales a lo largo del tiempo y se asume que no hay cambios significativos en la relación planta-clima a lo largo del periodo de tiempo en cuestión (Chaloner y Creber, 1990). Otro punto de vista, que es el más aceptado y en la actualidad comienza a ser de uso más frecuente, se basa en las adaptaciones y otras respuestas de las plantas al ambiente. por ejemplo la forma de la hoja y el crecimiento de los anillos en la madera. Se hace la suposición de que ciertas características de las plantas que se preservan en los fósiles se pueden usar como proxies climáticos y paleoambientales, siendo independientes de la posición sistemática de los grupos de plantas (Blonder y Enquist, 2014). Es importante resaltar que no existe una técnica óptima, universalmente aplicable y absolutamente segura para obtener información paleoclimática y paleoambiental a partir de plantas fósiles, pero la información obtenida a partir de éstas es suficiente para inferir ciertos parámetros (Uhl y Mosbrugger, 1999).

El estudio morfológico de paleoclimas y paleoambientes se basa en los caracteres de las hojas. Así, la metodología asume que los caracteres foliares como tamaño, forma y margen representan estrategias evolutivas utilizadas por las plantas para adaptarse al ambiente en que se encuentran (Wolfe, 1993; Huff *et al.*, 2003). El patrón de venación se construye tempranamente durante el desarrollo de la hoja y debe tener una estructura que corresponda, pero que no exceda, las demandas ambientales que las hojas experimentan de forma normal (Blonder y Enquist, 2014) Si la capacidad de un carácter para mostrar una respuesta al ambiente fuera débil, los valores de los caracteres en su lugar reflejarían condiciones de variación en el tiempo.

Hasta hoy, una de las herramientas más utilizadas para calcular parámetros paleoambientales es el propuesto por Wolfe (1993), quien intentó mejorar la precisión en los estimadores de paleotemperaturas y proponer un método para inferir otras variables climáticas, incluyendo estacionalidad de la temperatura y precipitación. CLAMP (Climate-Leaf Analysis Multivariate Program) es una técnica estadística usada para inferir señales climáticas a partir de la fisionomía de las hojas de dicotiledóneas (Wilf, 1997). Ésta técnica engloba 31 caracteres morfológicos de hojas provenientes de 173 localidades, mayormente en Norteamérica y Japón (Gregory-Wodzicki, 2000). En el caso de la temperatura anual, los métodos analíticos de CLAMP, que teóricamente deben producir estimados estadísticamente significativos, no siempre arrojan resultados que se relacionan con predicciones obtenidas en floras actuales usando otros análisis climáticos como son los análisis de margen foliar (Huff *et al.*, 2003; Wilf, 1997). Se ha propuesto que la falta de relación entre predicciones paleoclimáticas obtenidas con estas dos metodologías pueden deberse a que CLAMP llega a ser subjetivo en la codificación de la matriz de caracteres. Por lo que las predicciones pueden no ser las más apegadas a la realidad (Wilf, 1997). Por esta razón se deben seguir explorando metodologías que permitan hacer inferencias desde un acercamiento más objetivo como puede ser la LVD.

2.4. Análisis digital de imágenes

Con el avance de la tecnología se han desarrollado diversas metodologías útiles en el estudio de la morfología de las plantas, que facilitan y hacen más rápidos los procesos de obtención de resultados (www.plant-image-analysis.org). Para poder obtener mediciones haciendo uso de estas nuevas tecnologías es necesario contar con fotografías digitales de los ejemplares a estudiar. Para saber mejor como es que estos programas trabajan para obtener las mediciones, debemos conocer un poco más acerca de cómo se realizan los análisis de imágenes digitales (Molinas y Campos, 1993; Das *et al.*, 2014).

Las ventajas de la imagen digital frente a la analógica vienen dadas por las múltiples posibilidades de manipulación que nos ofrece la primera. Entre estas ventajas está la posibilidad de procesar dichas imágenes para obtener información; reconocer, contar y medir tamaño, forma o densidad de determinados objetos. Lo cual con una correcta preparación de la muestra, está al alcance de cualquier computadora personal equipada con un software adecuado de análisis de imágenes.

Desde un punto de vista físico, una imagen puede considerarse como un objeto cuya intensidad luminosa y de color puede variar de un punto a otro. Si se trata de imágenes monocromas (blanco y

negro), se pueden representar como una función continua $f(x,y)$, donde (x,y) son coordenadas y el valor de f es proporcional a la intensidad luminosa (nivel de gris) en un punto dado (Martínez-Nistal y Sampedro, 1995).

La digitalización consiste en la descomposición de la imagen en una matriz de $M \times M$ puntos, donde cada uno tiene un valor proporcional a su nivel de gris. Dado que este valor puede ser cualquiera dentro de un rango continuo, es preciso dividir dicho rango en una serie de K intervalos de forma que el nivel de cada punto sea asignado a uno de los valores que representa dicho intervalo. El número de niveles de gris y las dimensiones de la matriz (número de filas por número de columnas) delimitan la capacidad de resolución de la imagen digital (Martínez-Nistal, 2001).

El análisis y proceso digital de imágenes (AI) engloba una serie de técnicas computarizadas que comprenden operaciones cuyo origen es una imagen y su finalidad es otra imagen que permita obtener medidas de superficie, densidades medias y longitudes. Para la aplicación del AI se requieren imágenes digitalizadas que son analizadas mediante un software apropiado. Cada elemento en que se divide la imagen recibe el nombre de "pixel" (picture element). El valor del pixel en la imagen de salida puede ser en función del valor que tenía en la imagen de entrada o de los valores de sus pixeles vecinos (Martínez-Nistal, 2001). Los resultados pueden ser exportados a hojas de cálculo para su tratamiento, ya que agiliza el manejo estadístico y facilita la realización de estudios que requieren de un número muy elevado de muestras (Molinas y Campos, 1993).

En el procesamiento de imágenes, el método más usado para extraer objetos de una imagen es el thresholding (Kapur *et al.*, 1985). En este método la clasificación es el proceso por el cual, los pixeles pertenecientes a una imagen son divididos en clases normalmente dos: objetos de interés y fondo. El denominado "thresholding" se utiliza para convertir una imagen de niveles de gris en una imagen binaria a partir de umbral (tono de gris definido). Cada pixel es clasificado como ON-blanco u OFF-negro dependiendo de si el valor del nivel de gris excede un umbral o no. La clasificación puede realizarse de modo interactivo visualizando cómo queda la imagen según varía el valor del umbral, o de modo automático, donde determina el color de los umbrales (Martínez-Nistal, 2001).

2.5. Medición de LVD a partir del análisis de imágenes digitales

Entre las diferentes metodologías usadas para cuantificar las venas en una imagen digital, se encuentra la de medir las venas de forma individual en cada imagen, trazando los largos de las venas de

forma manual por medio de programas de análisis de imágenes ampliamente usados como es Image J (Rasband, 1997-2014).

Para obtener los estadísticos que describen la venación de la hoja, se aplican algoritmos de segmentación de imágenes contenidos en el software. Esto permite extraer la posición, grosor y largo de cada segmento de la vena y su conectividad con otros segmentos (Price *et al.*, 2011). A través del thresholding, se pasan a primer plano algunas regiones de la imagen y se distinguen las venas del resto de la lámina. Esto resulta en una imagen binaria que puede ser limpiada y procesada (Bohn *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2014).

Idealmente, los esfuerzos de medición deben tener por objetivo incluir grandes cantidades de ejemplares de hojas, a una alta resolución con suficiente aumento para observar y resolver todos los órdenes de venación. Es aquí donde el trazado manual de venas, en algunos casos, puede mejorar la precisión. Es importante recalcar que al marcar las venas se debe ser muy cuidadoso ya que se pueden introducir errores a causa de que los usuarios difieren en la interpretación de que es lo que constituye una vena (Price *et al.*, 2014).

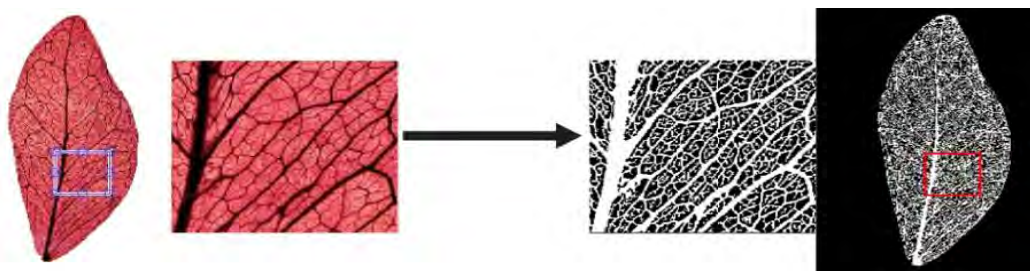


Fig. 4: Imágenes binarias (thresholding).

Para resolver este problema, se ha desarrollado como herramienta un software asistido por el usuario, que extrae las estructuras macroscópicas de las venas directamente de las imágenes de las hojas. El programa llamado Leaf Extraction Framework Graphical User Interface (Leaf Gui) (Price *et al.*, 2011) fue desarrollado en MATLAB y construido con base en una serie de algoritmos designados para el thresholding, limpieza y segmentación de imágenes de hojas en las que la estructura de las venas es visible. Este software permite medir las propiedades de millones de venas mucho más rápido que con las herramientas de medición manual y está diseñado para botánicos y ecólogos que deseen analizar la estructura macroscópica de las venas en las hojas (Price *et al.*, 2011). Lef Gui es una herramienta que toma una imagen de la hoja de interés y a partir de una serie de pasos interactivos limpia la imagen y regresa la información como otra imagen que muestra la estructura de las venas de la hoja (Georgia Institute of Technology Research news, 2011). Existen dos tipos de thresholding en

Leaf Gui y se pueden seleccionar de acuerdo a las características de la foto que se quiera analizar. El thresholding global toma una copia de la escala de grises de la imagen original donde los pixeles se valoran en rangos de 0 a 0.255, desafortunadamente esta forma global produce resultados pobres para imágenes poco iluminadas. El thresholding adaptativo corrige las imágenes con poca iluminación comparando la intensidad de cada pixel con un valor dado de intensidad (Fig. 4) (Price *et al.*, 2011). Leaf Gui en esta tesis es de principal importancia debido que ha permitido realizar mediciones de LVD de forma fácil y sistematizada, midiendo de forma eficaz grandes cantidades de muestras tanto actuales como fósiles.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la LVD de las hojas es un tema que apenas comienza y específicamente, en hojas fósiles no se ha prestado mucha atención. Esto puede deberse a la falta de una metodología preestablecida que permita su medición de forma rápida, sencilla y fácilmente repetible.

Dentro de los pocos estudios sobre LVD que existen, la mayoría se enfocan en la variación morfológica del carácter y su respuesta a cambios climáticos (Uhl y Mosbrugger, 1999; Brodribb *et al.*, 2007; Brodribb y Jordan, 2011; Zhu *et al.*, 2012; Bloner y Enquist, 2014; Carnis *et al.*, 2014). Sin embargo, el conocimiento actual de la relación entre la LVD y el clima hace difícil la predicción de diferentes factores como temperatura, precipitación y humedad (Blonder y Enquist, 2014).

Por medio de una técnica basada en la comparación de diferentes métodos de mediciones de LVD de hojas actuales y la aplicación y prueba de estos métodos en hojas fósiles, en este trabajo se propone una metodología a seguir para obtener mediciones de este carácter, tanto en hojas actuales como en ejemplares fósiles para así en un futuro poder realizar estudios más enfocados en la obtención de parámetros para el uso de la LVD como proxy paleoclimático.

4. OBJETIVOS

- 1.- Realizar diferentes mediciones de LVD en hojas actuales para proponer un método de medición de LVD en hojas fósiles.
- 2.- Aplicar en las hojas fósiles de dos localidades miocénicas (San Esteban Tizatlán, Tlaxcala e Ixtapa, Chiapas) la propuesta del método de medición de LVD de este trabajo y determinar si se observan diferencias de LVD y si están relacionadas o no con la diferencia de temperatura media anual propuesta anteriormente por medio del método CLAMP.

5. MÉTODOS

De la colección de hojas aclaradas del Instituto de Geología, UNAM, del material que en ese momento se encontraba disponible y mejor procesado, se seleccionaron un total de 25 hojas actuales pertenecientes a 20 familias según APG (Anexos 2 y 3). Estas hojas fueron fotografiadas a contraluz con una cámara digital Canon G10. Para aumentar la visibilidad de las venas en las fotos, las imágenes se mejoraron con el uso del editor de imágenes Photoscape V.3.6.3 (MOOII, Tech), con el que se aumentó el contraste y homogeneidad de la imagen. Posteriormente, con el uso Photoshop C6 V.13.0 se recortó la imagen, se puso escala y se mejoró el tamaño.

Con estas hojas actuales se evaluaron seis parámetros para encontrar la forma óptima en que se deben presentar las imágenes para medirlas con el programa Leaf Gui. Los seis parámetros fueron: tipo de marcaje (Sección 5.2), zona de medición (Sección 5.3), área (Sección 5.4), altos órdenes de venación (Sección 5.5) y ruido (Sección 5.6).

En todos los análisis se midió la LVD de las fotografías de las hojas ya procesadas con el programa Leaf Gui. Para esto, se usaron como parámetros de thresholding adaptativo los predeterminados por el programa, que fueron un umbral de 10 en small window y de 0.001 en thresholding. En el caso del thresholding global se usaron los umbrales aproximados de 70.175 para las imágenes que mantenían la hoja original de fondo (Fig. 6A y 6B) y de 166.631 para las imágenes de la venación marcada (Fig. 6C). Estos umbrales fueron seleccionados porque fue donde se observó que la hoja se definía mejor al hacer el thresholding (Fig. 5) (Anexo 4).

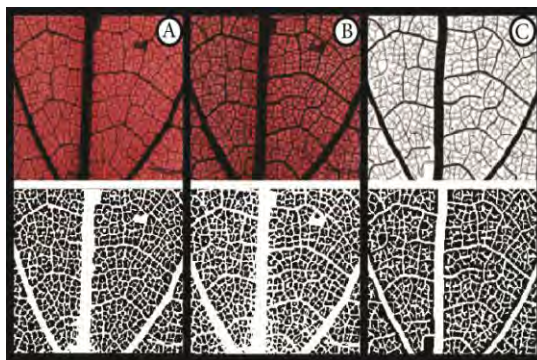


Fig. 5: Thresholding en imágenes actuales. Tres tipos de imágenes que se ingresaron al programa Leaf Gui (arriba) e imágenes que regresa el programa después de realizar el thresholding (abajo). A. Imagen original; B. Imagen original con las venas marcadas; C. Venas marcadas eliminando la imagen original.

Para obtener los valores de LVD fue necesario medir el largo de las venas, valor obtenido por medio de Leaf Gui entre el área muestreada de la lámina. Para los casos dónde fue necesario medir la LVD de la lámina completa (Secciones 5.2, 5.3 y 5.4), fue necesario obtener el área total de la hoja, cálculo que fue realizado con el programa Image J (Rasband, 1997-2014).

Los resultados obtenidos en cada tipo de medición se compararon con el programa Statgraphics Centurion XVI V. 16.1.11. (StatPoint technologies, Inc.) mediante pruebas no paramétricas debido a que los datos no muestran distribuciones de tipo normal y se cuenta con poblaciones menores a 30 datos. Kruskal-Wallis se aplicó en los análisis que comparaban más de 2 poblaciones (Secciones 5.2, 5.3, 5.4 y 5.8) con la prueba post-hoc LSD de Fisher; U de Mann-Whitney fue seleccionada para los análisis que requerían comparación de dos poblaciones relacionadas (Secciones 5.3, 5.5, 5.6 y 5.9) y Wilcoxon se utilizó en la comparación de las localidades por comparar dos poblaciones independientes (Sección 5.11).

5.1. Marcado de los diferentes tipos de imágenes

A las imágenes mejoradas de las hojas se les marcaron todas las venas, con ayuda de una tableta digitalizadora Intuos Creative Pen Tablet, marca Wacom modelo CTL480, haciendo uso de Photoshop, poniendo en diferentes capas cada orden de venación.

Una vez marcadas todas las hojas se eliminaron algunas capas para hacer las imágenes necesarias. Principalmente se obtuvieron 3 tipos de imagen (Fig. 6), que corresponden a la hoja original (Fig. 6A), las venas marcadas sobre la hoja original (Fig. 6B) y las venas marcadas quitando la capa de la hoja original (Fig. 6C y Anexo 5).

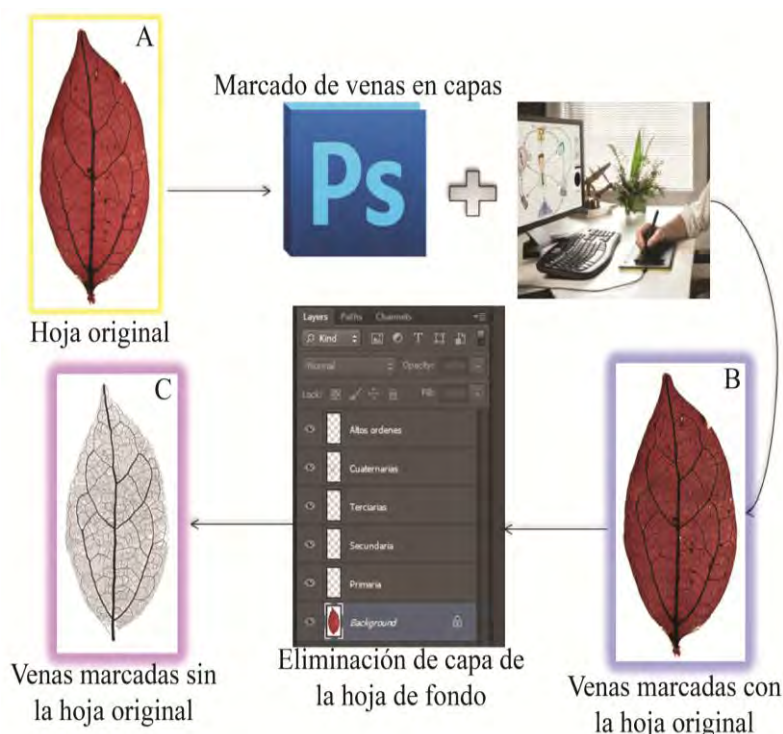


Fig. 6: Marcado de hojas en capas. Tres tipos de imagen obtenidos con el marcaje de las venas. A. Hoja original; B. Venas marcadas con la hoja original de fondo; C. Venas marcadas sin la hoja original de fondo.

5.2. Análisis de tipo de marcaje

De cada una de las 25 hojas aclaradas, se obtuvieron tres imágenes, dando un total de 75 imágenes de cada especie actual incluidas en este estudio. Se obtuvo el área por medio del programa Image J (Rasband, 1997-2014) y posteriormente se obtuvieron las mediciones de las 75 imágenes para obtener la LVD. Leaf Gui no da de primera instancia la LVD, pero sí aporta el largo total de tejido vascular, que posteriormente se tiene que dividir entre el área medida. Por eso, con las mediciones obtenidas por medio de Leaf Gui se conformó una base de datos con todas las mediciones y las áreas obtenidas con Image J (Rasband, 1997-2014), para en esta misma base de datos realizar el cálculo de las LVD.

Después de calculada la LVD de cada hoja y debido a que no es posible asumir una distribución normal de los datos por medio del programa Statgraphics se compararon los datos usando Kruskal-Wallis para comprobar la existencia de diferencias significativas entre las LVD obtenidas con cada tipo de marcaje (Fig. 6). Se seleccionó en este caso Kruskal-Wallis. También se utilizó la prueba post-hoc LSD de Fisher, para mostrar entre que muestras se encuentran las diferencias significativas. Ambas pruebas se hicieron a un 95% de confianza.

5.3. Análisis de zona de medición y análisis de borde

En las improntas foliares pueden estar conservadas sólo algunas partes de la hoja. Por ejemplo en ciertos ejemplares se puede contar con mediciones del ápice y en otros de la base o de la parte media. Esto puede acarrear problemas si la LVD cambia en distintas partes de la hoja. Para evaluar si esto sucede, se tomaron mediciones de un centímetro cuadrado del ápice, de la parte media y de la base (Fig. 7), usando los tres tipos de imagen obtenidos en el análisis anterior (Fig.6). Los cuadros de los ápices, bases y mitades se midieron de forma individual y las mediciones se compararon con una prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de LSD, usando el programa Statgraphics ambas a un 95% de confianza.

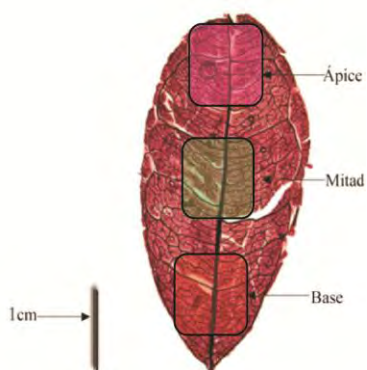


Fig. 7: Ejemplo de las áreas de zonas de medición.

Por otro lado, para observar si existen diferencias entre la LVD en el centro de la lámina y la de los bordes de la misma; de cada imagen de las venas de las hojas (Fig. 6C) se seleccionaron cuadros de 10 diferentes tamaños. Por cada tamaño fueron utilizados dos cuadros del borde y dos cuadros del centro de la lámina (Fig. 8). Estas áreas fueron definidas a partir de encontrar el cuadrado de área más pequeña que abarcara venas y lámina al mismo tiempo. El tamaño de este primer cuadrado se tomó como unidad para ir creciendo las áreas hasta alcanzar el cuadrado más grande que entrara completamente en todas las láminas estudiadas. Se midió la LVD de cada cuadrado y luego se compararon los resultados del borde con los de la parte media de la lámina por medio de una prueba de Wilcoxon a un 95% de confianza.

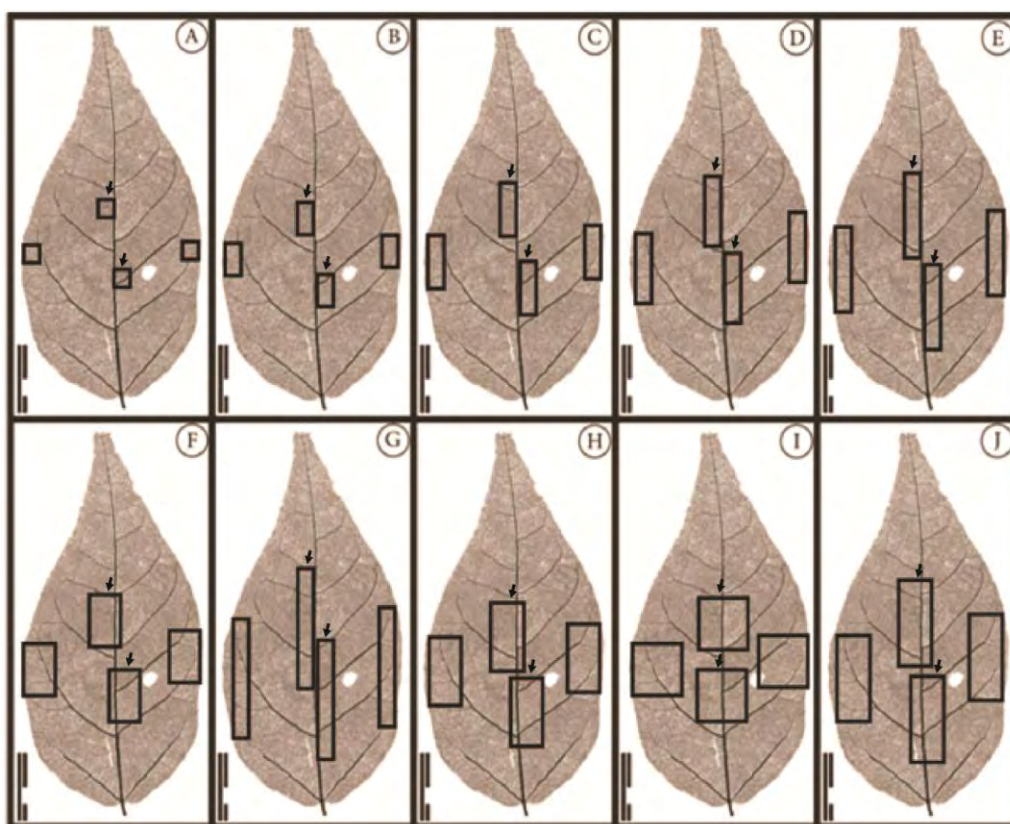


Fig. 8: Ejemplo de áreas de análisis de borde en cm^2 . Áreas marcadas y medidas en las imágenes de las hojas. A. 0.062; B. 0.125; C. 0.187; D. 0.25; E. 0.312; F. 0.375; G. 0.43; H. 0.5; I. 0.562; J. 0.62. (Escala=1cm). Flechas señalan cuadros utilizados como muestra del centro de la lámina.

5.4. Análisis de área

Cuando se trabaja con hojas fósiles, muchas veces se puede obtener una gran cantidad de material bien preservado, pero no siempre es tan fácil encontrar muestras suficientes y con características óptimas para obtener buenas mediciones de la LVD. En general las hojas con venaciones

bien preservadas casi nunca están totalmente completas. Es por ello que se analizó cuál es el área mínima que debe tener una muestra de un ejemplar de hoja fósil para ser útil cuando se trabaja con LVD. Para saber cómo afecta el área de lámina de donde se toma la muestra y encontrar el área mínima más adecuada para las mediciones en cada una de las 25 hojas se seleccionaron tres secciones de lámina de áreas definidas de la misma forma que en el análisis anterior (Fig. 9). La LVD encontrada en cada tamaño de cuadro se comparó usando el programa Statgraphics por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y LSD de Fisher a un 95% de confianza.

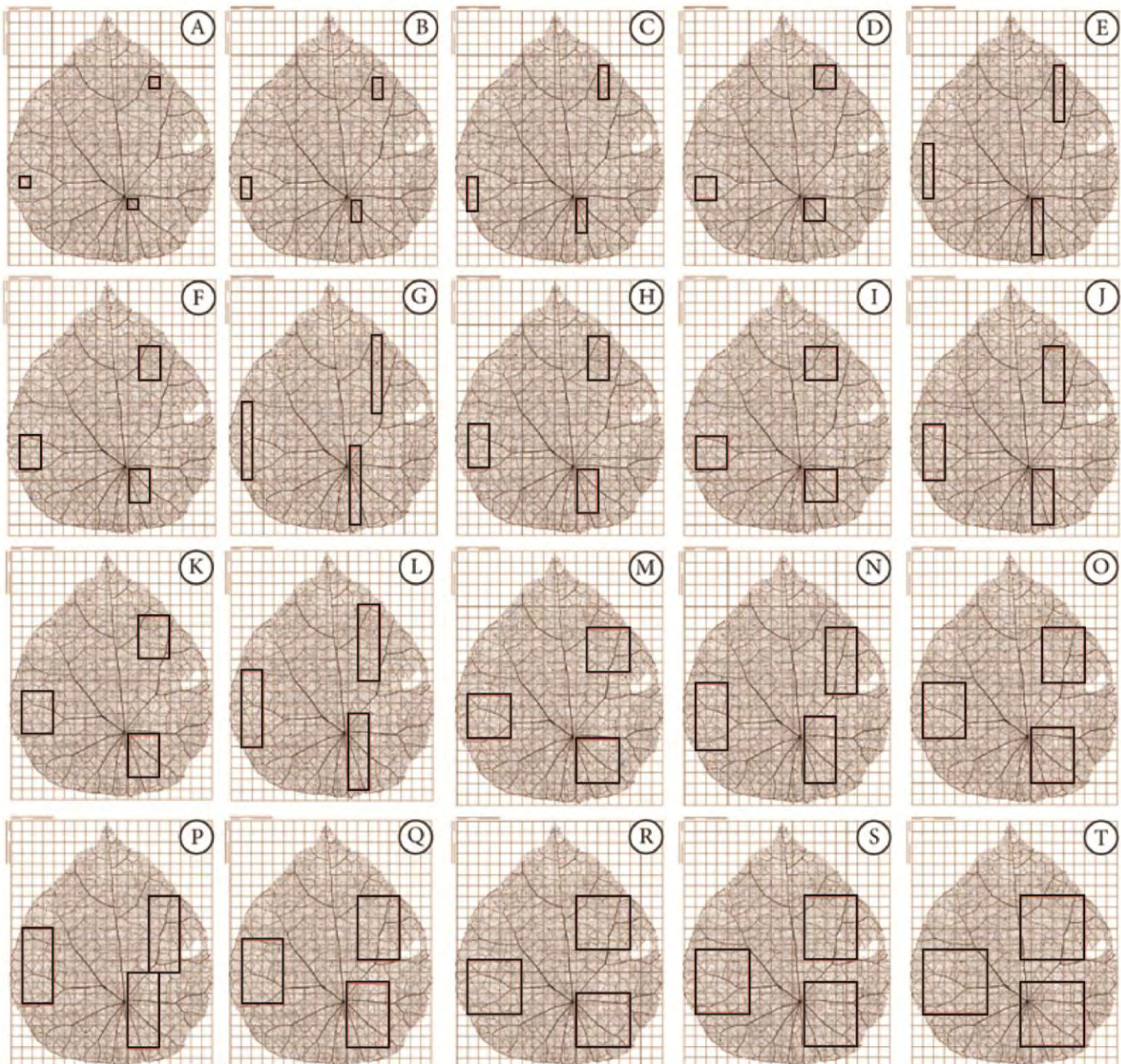


Fig. 9: Áreas en cm^2 usadas en el análisis de área: A. 0.062; B. 0.125; C. 0.187; D. 0.25; E. 0.312; F. 0.375; G. 0.43; H. 0.5; I. 0.562; J. 0.62; K. 0.75; L. 0.875; M. 1; N. 1.125; O. 1.25; P. 1.312; Q. 1.5; R. 1.56; S. 1.875; T. 2.187. (Escala=1cm)

5.5. Análisis de altos órdenes de venación

Se examinó si tomar en cuenta las venas de órdenes más bajos tenía alguna influencia significativa en la medición de la LVD. Los estudios de LVD, han demostrado que según en el ambiente en el que se encuentran las plantas, las venas que tienden a variar de forma más significativa son las de altos órdenes (Sack y Scoffoni, 2013; Blonder y Equist, 2014). En las hojas de mayor tamaño, si se utiliza un fragmento pequeño de lámina, se pueden omitir las venas de órdenes menores, pero en las hojas más pequeñas puede ocurrir que no se incluyan venas primarias y secundarias.

De las 25 hojas actuales marcadas como ya se mencionó (Fig. 6), se tomaron las imágenes que mantenían la hoja original de fondo (Fig. 6B y 13A) y se seleccionó un cuadro de 1cm^2 , al cual se le eliminaron las capas donde se marcaron las venas primarias, secundarias y terciarias (Fig. 10B). De igual forma se eligió para las 25 hojas, la imagen donde aparecen las venas marcadas sin la hoja original de fondo (Fig. 6C y 13C). En este último caso también se seleccionó aleatoriamente un segmento de un cm^2 al que se le eliminaron las capas que contenían marcadas las venas de primer, segundo y tercer orden (Fig. 10D). Todas las mediciones de LVD se compararon usando el programa Statgraphics y una prueba de Wilcoxon a un 95% de confianza.

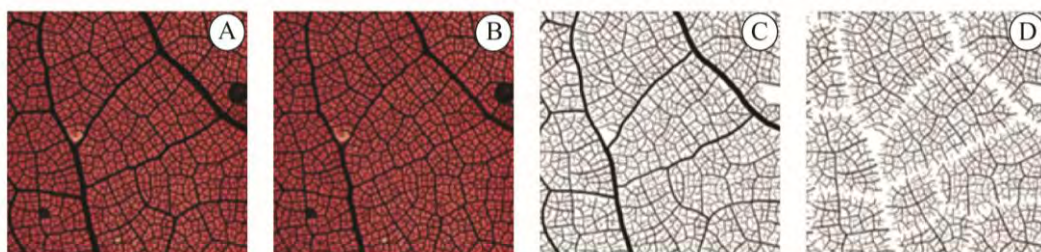


Fig. 10: Ejemplos de imágenes usadas en el análisis de órdenes de venación: A. Hoja original con todas las venas marcadas; B. Hoja original a la que solo se le marcaron los altos órdenes de venación; C. Todas las venas marcadas sin la hoja original; D. Altos órdenes de venación marcados sin la hoja original.

5.6. Análisis de ruido

El programa Leaf Gui presenta la opción de eliminación de ruido en la imagen (píxeles que erróneamente se interpretan como venas). Esta opción de quitar el ruido se brinda como una herramienta que ayuda a delimitar la hoja en toda la imagen, quitando todo lo que podrían ser píxeles adicionales a la hoja. Hacer uso de esta opción puede resultar contraproducente porque se puede llegar a eliminar sin querer píxeles de la hoja y esto introduciría error en los resultados. En esta sección se quiso observar el efecto del ruido sobre las mediciones, y saber si los valores de las hojas sin ruido se acercan a los valores obtenidos al medir las imágenes de las venas marcadas (Fig. 6C), para evaluar que tan necesario es eliminar esta imagen original.

En este caso se utilizaron las mismas imágenes que en el análisis anterior (Fig. 10) y por medio del programa Laf Gui se les aplicó un tratamiento para eliminar el ruido. La eliminación de ruido consiste en dar un valor que representa números de pixeles contiguos, eliminando todos los grupos de pixeles formados por un número mayor o igual al valor dado (Fig. 11). De igual forma se midieron las mismas áreas de las hojas seleccionados para el análisis de altos órdenes de venación (Fig. 7), pero esta vez se eliminó el ruido de la imagen. Después se compararon las densidades de venación obtenidas para cada tipo de marcaje, por medio de la prueba de Wilcoxon.

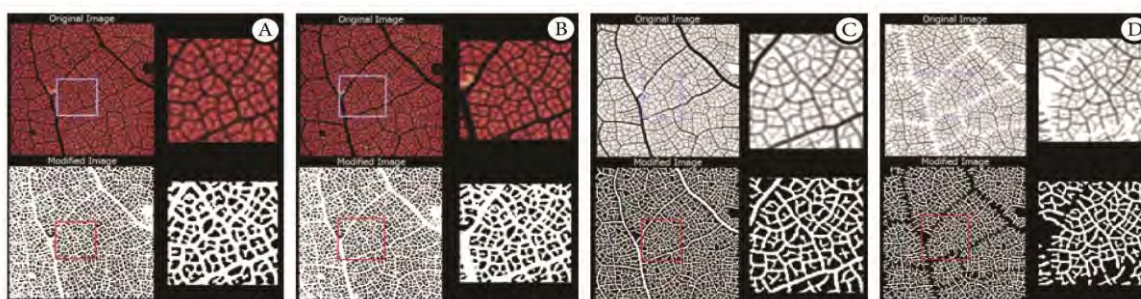


Fig. 11: Eliminación de ruido. Imágenes binarias a las que se les aplicó el tratamiento para eliminar el ruido. A. Hoja con todas las venas marcadas; B. Hoja a la que solo se le marcaron los altos órdenes de venación; C. Todas las venas marcadas sin la hoja original; D. Altos órdenes de venación marcados sin la hoja original.

5.7. Análisis con hojas fósiles

Se revisaron aproximadamente 1,650 ejemplares de improntas foliares de la localidad de San Esteban Tizatlán, y 3,500 ejemplares de Ixtapa, de los cuales se seleccionaron los ejemplares mejor preservados, dando un total de 127 muestras para la primera localidad y 141 para la segunda.

De ambas localidades, los morfotipos seleccionados fueron fotografiados y cada imagen fue editada para resaltar lo más posible las venas. Finalmente de las imágenes editadas, se seleccionaron las 50 muestras de cada localidad (38 morfotipos en San Esteban Tizatlán y 43 morfotipos en Ixtapa) en las que se observaban mejor los patrones de venación y fueron las que se midieron con el programa Leaf Gui para los dos análisis que se desarrollaron con hojas fósiles. De estas 100 imágenes se obtuvieron los tres tipos de imágenes (Fig. 6 y 15) de la misma forma que se hizo con las hojas aclaradas. Por medio del uso de la tableta digitalizadora y el programa Photoshop C6 V. 13.0 x64 marcando cada orden de venación en una capa diferente.

La localidad de **Ixtapa** (Fig. 12) se encuentra dentro del área de Ixtapa-Solayó, que a su vez está ubicada en la región centro-septentrional del estado de Chiapas, entre los 16°45'-16°55' norte y los 92°50'-93°00' oeste, a unos 28 Km al este-noreste de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez. Geológicamente pertenece a la Provincia de Sierras Plegadas Norteñas y a la subprovincia de Depresión de Ixtapa.

Los fósiles aquí estudiados se encontraron dentro de la Formación Ixtapa del Grupo Río Hondo. Con base en estudios de hojas usando la metodología de CLAMP para calcular parámetros paleoclimáticos, Hernández-Villalva (2012) propone un clima semifrío-húmedo, con una temperatura de 8.86°C a 12.1°C, precipitación anual de 1119.1 mm y humedad relativa del 67.29%. Se interpreta que la localidad se localizaba en un escenario de transición, donde se encontraba la presencia de floras de climas tropicales que se adaptaban a los cambios climático-ambientales (Fig. 14A).

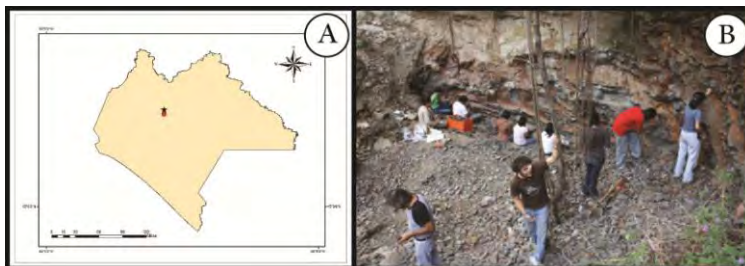


Fig. 12: Ixtapa, Chiapas. A. Mapa del estado de Chiapas, destacando la localización de Ixtapa (estrella); B. Foto de la zona en la localidad donde se obtuvieron las hojas fósiles.

La localidad de **San Esteban Tizatlán** (Fig. 13) se encuentra a 5 Km al norte de la ciudad de Tlaxcala, en las coordenadas 19° 20' 33" norte y 98° 13' 18" oeste; formando parte de una sucesión sedimentaria conocida como Bloque Tlaxcala (INEGI, 1981). Los parámetros paleoclimáticos calculados por Domínguez-De la Torre (2013) con base en CLAMP sugieren que en la región predominaba un clima semicálido-húmedo, con temperaturas entre 17.2°C y 26.195°C, con una precipitación anual de 693.8 mm y humedad relativa del 59.1% (Fig. 14B).

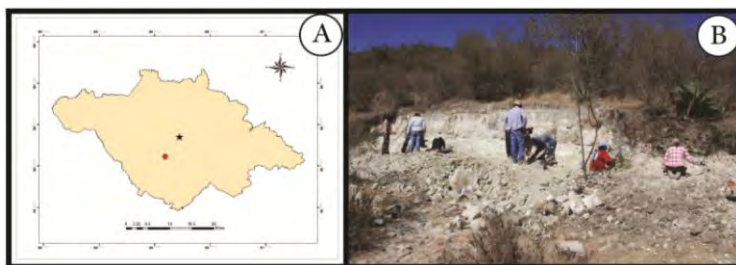


Fig. 13: San Esteban Tizatlán, Tlaxcala. A. Mapa del estado de Tlaxcala destacando la localización de San Esteban Tizatlán (estrella); B. Foto de la zona en la localidad donde se obtuvieron las hojas fósiles.



Fig. 14: Reconstrucción de las localidades fosilíferas. A. San Esteban Tizatlán (Mioceno tardío). Reconstrucción hecha por Aldo Domínguez de la Torre; B. Ixtapa (Mioceno temprano). Reconstrucción hecha por René Valverde Esparza (Tomado de: Cevallos-Ferriz y Calvillo-Canadell, 2012).

5.8. Análisis de tipos de marcaje en fósiles

De cada una de las 100 muestras fósiles (Anexos 6 y 7), se seleccionaron áreas de 25 mm² del área que se consideró mejor preservada en cada hoja fósil (Anexos 8 y 9) y se obtuvieron los tres tipos de imágenes, hoja original (Fig. 6A y 15A), venas marcadas con hoja de fondo (Fig. 6B y 15B) y venas marcadas sin hoja de fondo (Fig. 6C y 15C y Anexos 8 y 9). En todas la imágenes se midió la LVD usando Leaf Gui con la misma metodología que en las hojas actuales (Sección 5.2) y se comparó cada tipo de marcaje usando las hojas de ambas localidades juntas con una prueba de Kruskal-Wallis y la prueba LSD a un nivel de confianza del 95%.

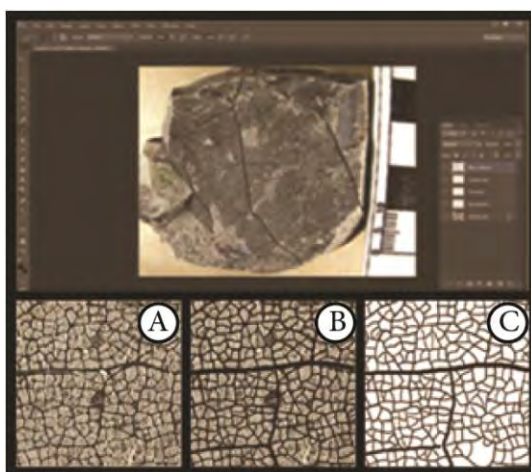


Fig. 15: Marcado de venas en hojas fósiles. Imágenes obtenidas para los tres tipos de marcado. A. Fósil original; B. Fósil marcado; C. Venas marcadas

5.9. Análisis de ruido en fósiles

Al igual que en las hojas actuales, se utilizaron las imágenes de las venas marcadas con la hoja original de fondo (Fig. 6B y 15B) y sin ella (Fig. 6C y 15C), y a cada imagen se le aplicó el tratamiento para eliminar el ruido. También se midieron los mismos cuadros seleccionados, pero sin el tratamiento (Sección 5.6). Finalmente se compararon las LVD obtenidas de las mediciones de las imágenes con y sin ruido por medio de una prueba de Wilcoxon a un 95% de confianza.

5.10. Comparación de las LVD de hojas actuales y fósiles

Para cada localidad existe un trabajo previo en el que se calcularon los parámetros paleoclimáticos a partir de CLAMP y además se hicieron identificaciones taxonómicas de algunos fósiles (Hernández Villalva, 2012 y Domínguez de la Torre, 2013). Entre los ejemplares estudiados en San Esteban Tizatlán se encuentran dos hojas fósiles identificadas por Domínguez de la Torre (2013) como afines a *Pithecellobium* Mart y *Zygia* (Standl.) Britton & Rose (Fig. 17). En la colección de hojas

aclaradas del Instituto de Geología se encontraron dos hojas actuales aclaradas, pertenecientes a *Zygia konzattii* (Standl.) Standl. y *Pithecellobium pachypus* Pittier (Fig. 16). Estas últimas se compararon con los fósiles para hacer la identificación.

Tomando como premisa que las hojas pertenecen al mismo género, se comparó la LVD de las hojas actuales y fósiles para ver qué tan lejanos son los valores y observar con que método de marcado hay una menor diferencia en las mediciones. Para esto, las cuatro hojas (dos actuales y dos fósiles) se procesaron con los tres mismos tipos de marcaje que se hicieron en las hojas actuales (Fig. 6 y 15). En ambos casos se seleccionó un área de 0.8 Cm^2 , en las hojas fósiles del área mejor preservada, y en las actuales del ápice. Todas las imágenes se midieron con el tratamiento para quitar el ruido.

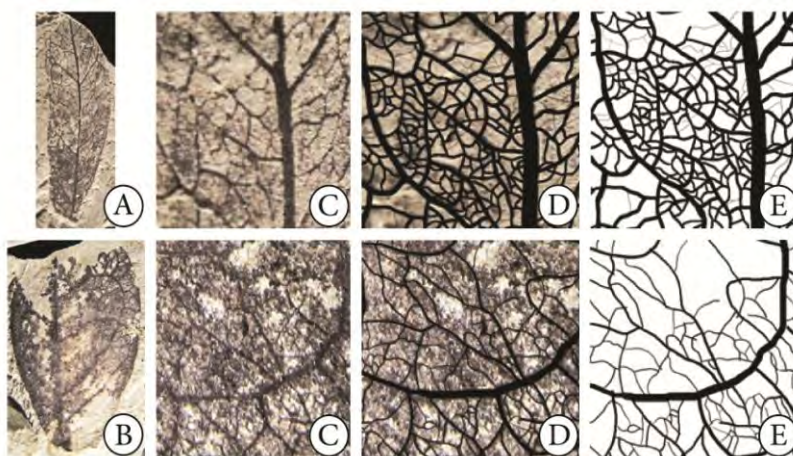


Fig. 16: Hojas fósiles identificadas por Domínguez de la Torre (2013). A. Ejemplar fósil al que se le encontró mayor afinidad con *Zygia konzattii*; B. Ejemplar fósil al que se le encontró mayor afinidad con *Pithecellobium pachipus*; C. Cuadro seleccionado de los ejemplares fósiles; D. Cuadros de los ejemplares fósiles con las venas marcadas; E. cuadro de las venas marcadas en los ejemplares fósiles. Cuadros de 0.8 cm^2 .

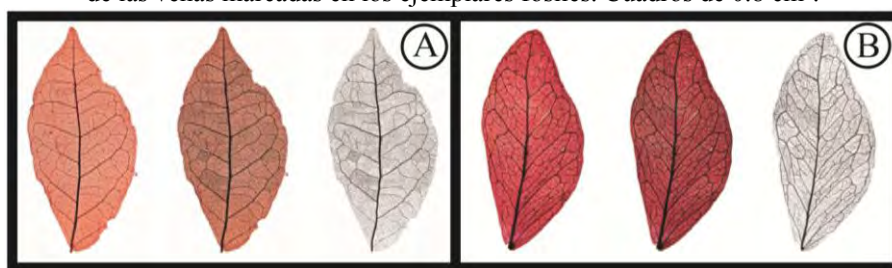


Fig. 17: Hojas aclaradas de *Zygia cozattii* y *Pithecellobium pachipus* usadas en la comparación con los fósiles, obtenidas de la colección de hojas aclaradas del Instituto de Geología, UNAM.

5.11. Comparación de la LVD de ambas localidades fosilíferas

Por medio de una prueba de U de Mann-Withney a un nivel de confianza del 95%, se compararon las mediciones de LVD de ambas localidades, utilizando solo las imágenes de las venas marcadas (Fig. 6C).

En los estudios realizados en 2013 por Domínguez de la Torre y Hernández Villalva respectivamente, se propone que Ixtapa tenía un clima más frío que San Esteban Tizatlán. Entonces, de acuerdo con Pagano (2015), se esperaría que al comparar ambas localidades, la LVD calculada para Ixtapa sea menor que la de San Esteban Tizatlán. La razón de esta diferencia se debería a que la temperatura calculada para Ixtapa es en promedio 11°C menor que la calculada para San Esteban Tizatlán. Entonces se podría comenzar a construir una hipótesis de cómo los valores de LVD pueden ligarse al clima.

6. RESULTADOS

Se midió un total de 25 hojas actuales de diferentes especies (Anexos 2 y 3), pertenecientes a la colección de hojas aclaradas del Instituto de Geología de la UNAM y 100 ejemplares fósiles de ambas localidades (38 morfotipos en San Esteban Tizatlán y 43 morfotipos en Ixtapa) (Anexos 6 y 7), obteniendo los siguientes resultados:

6.1. Análisis de tipo de marcaje

Se encontraron diferencias significativas entre los valores de LVD, siendo mayores en las imágenes originales y menores en las imágenes de las venas marcadas sin la hoja original de fondo ($H=6.196$, $gl=24$, $P=0.045$) (Fig. 18). Los valores obtenidos van de los 1.21 mm/mm² a 8.119 mm/mm², encontrándose las LVD más altas en la hoja original y las más bajas en las imágenes donde sólo se tienen las venas marcadas (Fig. 18).

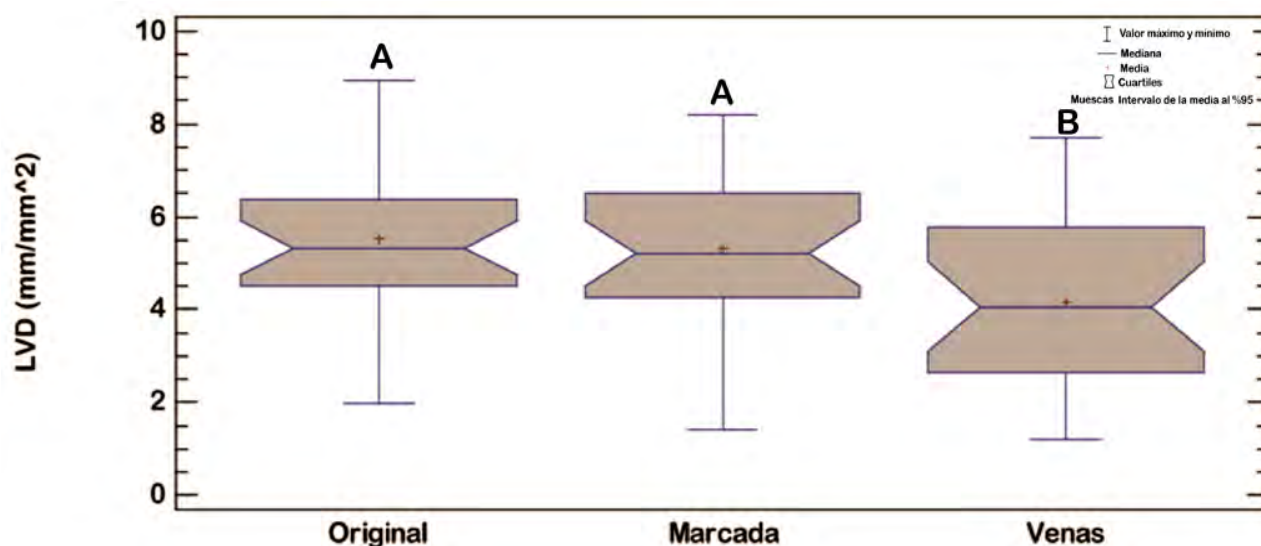


Fig. 18: Gráfica comparativa de las LVD de los tipos de marcaje. Los valores de las imágenes que solo muestran las venas marcadas son significativamente menores que las imágenes que conservan la imagen original. ($H=7.642$, $gl=24$, $P=0.022$). Letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de LSD de Fisher.

6.2. Análisis de zona de medición

En cuanto al análisis de la zona de medición no se encontraron diferencias significativas entre las zonas de la hoja donde se tomó la medición, por lo que es igual medir la hoja en la parte del ápice, mitad de la lámina o en la base. ($H=0.019$, $gl=24$, $P=0.999$) (Fig. 19).

Observando las LVD obtenidas se puede notar que van de 8.957 mm/mm^2 a 1.068 mm/mm^2 y en promedio para cada especie la diferencia entre el valor más alto y el más bajo de las tres zonas de medición (Fig. 7) es de 0.054 mm/mm^2 .

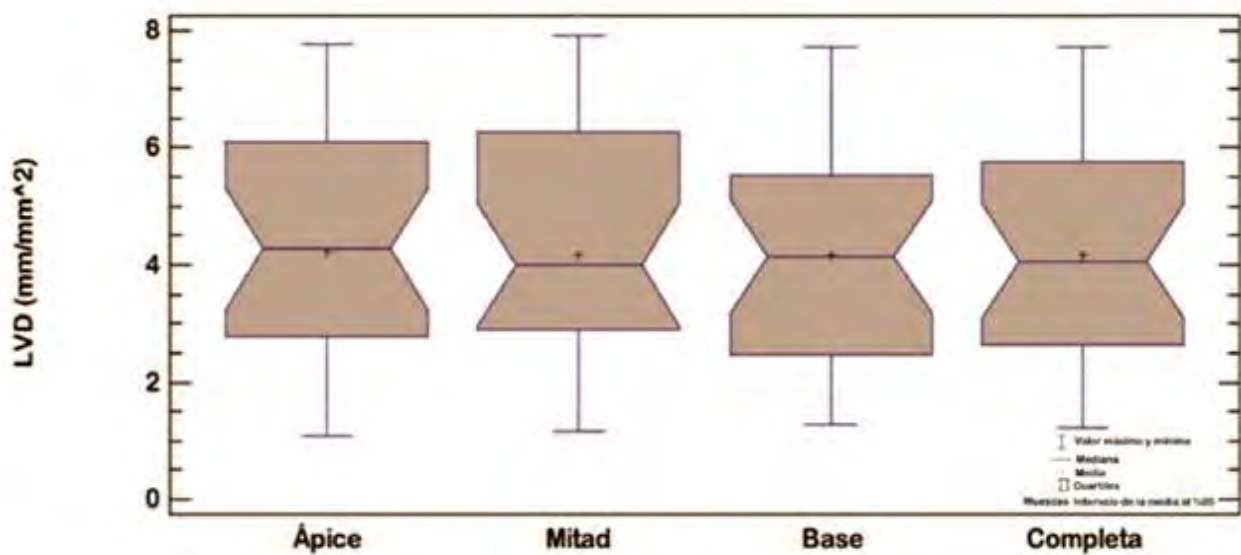


Fig. 19: Gráfica comparativa de las LVD de las zonas de medición. No existen diferencias significativas entre los valores. ($H=0.019$, $gl=24$, $P=0.999$).

Con la comparación de las LVD obtenidas del borde y del centro, no se encontraron diferencias significativas entre las mediciones que presenta la lámina en el borde y la LVD que se presenta en centro de la lámina ($W=0.061$, $gl=24$, $P=0.261$) (Tabla 1 y Fig. 20).

Tabla 1: Diferencias entre las LVD del borde y la LVD del centro de la lámina.
(Valores resaltados denotan diferencias significativas)

Espece	Diferencia en LVD borde/centro (mm/mm^2)	Significancia (P)
Todas las hojas	0.02	0.227
<i>Astronium lecointei</i>	0.14	0.008
<i>Canthium inerme</i>	0.18	0.264
<i>Carpodiptera ameliae</i>	0.22	0.502
<i>Cinnamomum breedlovei</i>	0.88	0.014

<i>Coccoloba hondurensis</i>	0.1	0.502
<i>Datura inoxia</i>	0.43	0.002
<i>Drypetes lateriflora</i>	0.4	1
<i>Ficus cotinifolia</i>	0.05	0.264
<i>Flacourtia jangomas</i>	0.27	0.264
<i>Hamamelis virginiana</i>	0.77	1
<i>Kadsura coccinea</i>	0.8	1
<i>Machilus breviflora</i>	0.11	0.502
<i>Ouratea mexicana</i>	0.12	0.502
<i>Oxandra lanceolata</i>	0.18	0.118
<i>Peltaea edouardii</i>	0.22	0.502
<i>Physodium adenodes</i>	0.18	0.118
<i>Zygia conzattii</i>	0.39	0.002
<i>Pithecellobium pachypus</i>	0.4	0.002
<i>Populus deltoides</i>	0.6	1
<i>Protium copal</i>	0.9	0.044
<i>Rapanea myricoides</i>	0.28	0.014
<i>Securidaca diversifolia</i>	0.01	1
<i>Stephania abyssinica</i>	0.9	0.823
<i>Tetracera sessiliflora</i>	0.31	0.004
<i>Tutcheria shinkoensis</i>	0.14	0.044

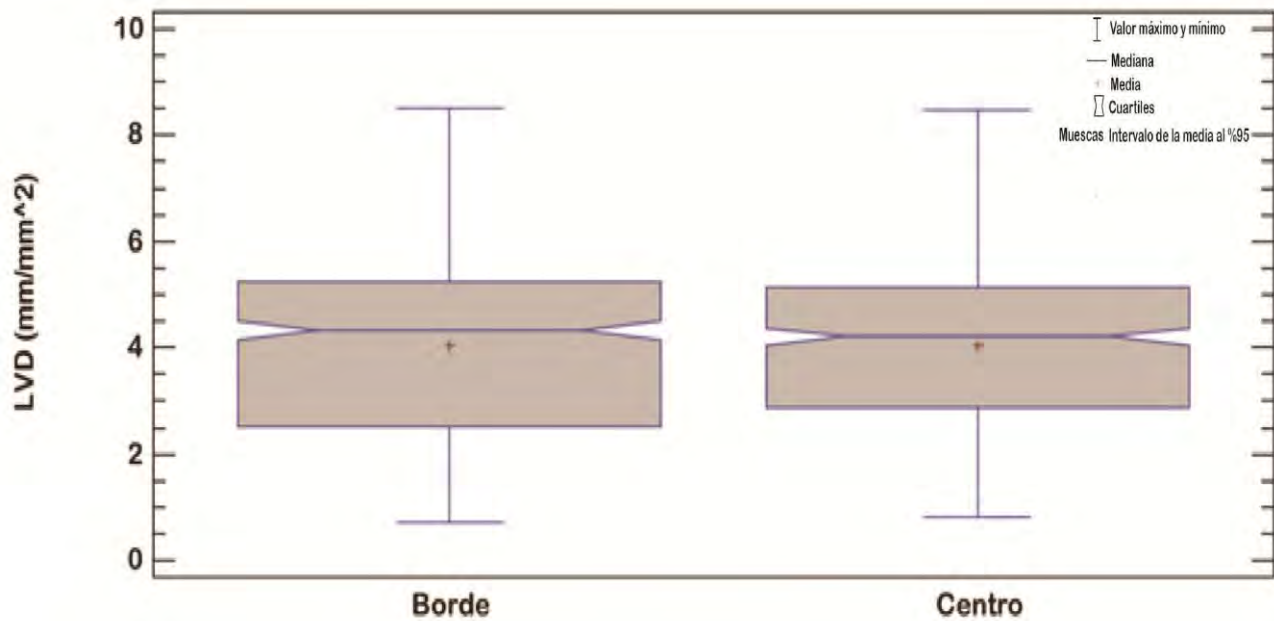


Fig. 20: Gráfica comparativa de las LVD del centro y borde de la lámina. No se observa una diferencia significativa. ($H=0.019$, $gl=24$, $P=0.261$).

6.3. Análisis de área

Si se comparan las LVD en las diferentes áreas de todas las hojas no se observan diferencias significativas en los valores obtenidos. Al analizar las áreas de cada especie por separado, la mayoría no presentan diferencias significativas entre las LVD en las diferentes áreas medidas (Tabla 2). Las desviaciones estándar de los valores por área se reducen de forma constante en las especies a partir de áreas mayores a 0.8 mm^2 (Fig. 21).

Tabla 2: Kruskal-Wallis obtenidas de las LVD de las 25 hojas actuales usando diferentes áreas de muestreo. (Valores resaltados representan diferencias significativas)

Espece	Diferencia En LVD mayor/menor (mm/mm ²)	Significancia (P)	Área de la lámina completa (mm ²)
Todas las hojas	0.8	0.165	
<i>Astronium lecointei</i>	2	0.008	4017
<i>Canthium inerme</i>	0.9	0.687	777.1
<i>Carpodiptera ameliae</i>	1	0.841	997.9
<i>Cinnamomum breedlovei</i>	0.6	0.884	927.2
<i>Coccoloba hondurensis</i>	1	0.027	1106.9
<i>Datura inoxia</i>	0.6	0.071	1465.5
<i>Drypetes lateriflora</i>	1.4	0.008	1386.3
<i>Ficus cotinifolia</i>	0.8	0.074	1311.9
<i>Flacourtia jangomas</i>	2.1	0.025	1156.3
<i>Hamamelis virginiana</i>	0.6	0.596	1433.5
<i>Kadsura coccinea</i>	1.05	0.043	833.3
<i>Machilus breviflora</i>	1.6	0.439	873.7
<i>Ouratea mexicana</i>	1.1	0.323	1181.4
<i>Oxandra lanceolata</i>	0.8	0.887	354.5
<i>Peltaea edouardii</i>	1.8	0.397	595.1
<i>Physodium adenodes</i>	1.2	0.8	759.9
<i>Zygia conzattii</i>	1.2	0.383	428.7
<i>Pithecellobium pachypus</i>	1.07	0.949	638.6
<i>Populus deltoides</i>	0.8	0.015	668.3
<i>Protium copal</i>	2.7	0.122	6364.9
<i>Rapanea myricoides</i>	0.8	0.468	722.3
<i>Securidaca diversifolia</i>	1.2	0.646	449.8
<i>Stephania abyssinica</i>	0.7	0.206	1896.2
<i>Tetracera sessiliflora</i>	0.6	0.087	1601.4
<i>Tutcheria shinkoensis</i>	1.5	0.023	2291.9

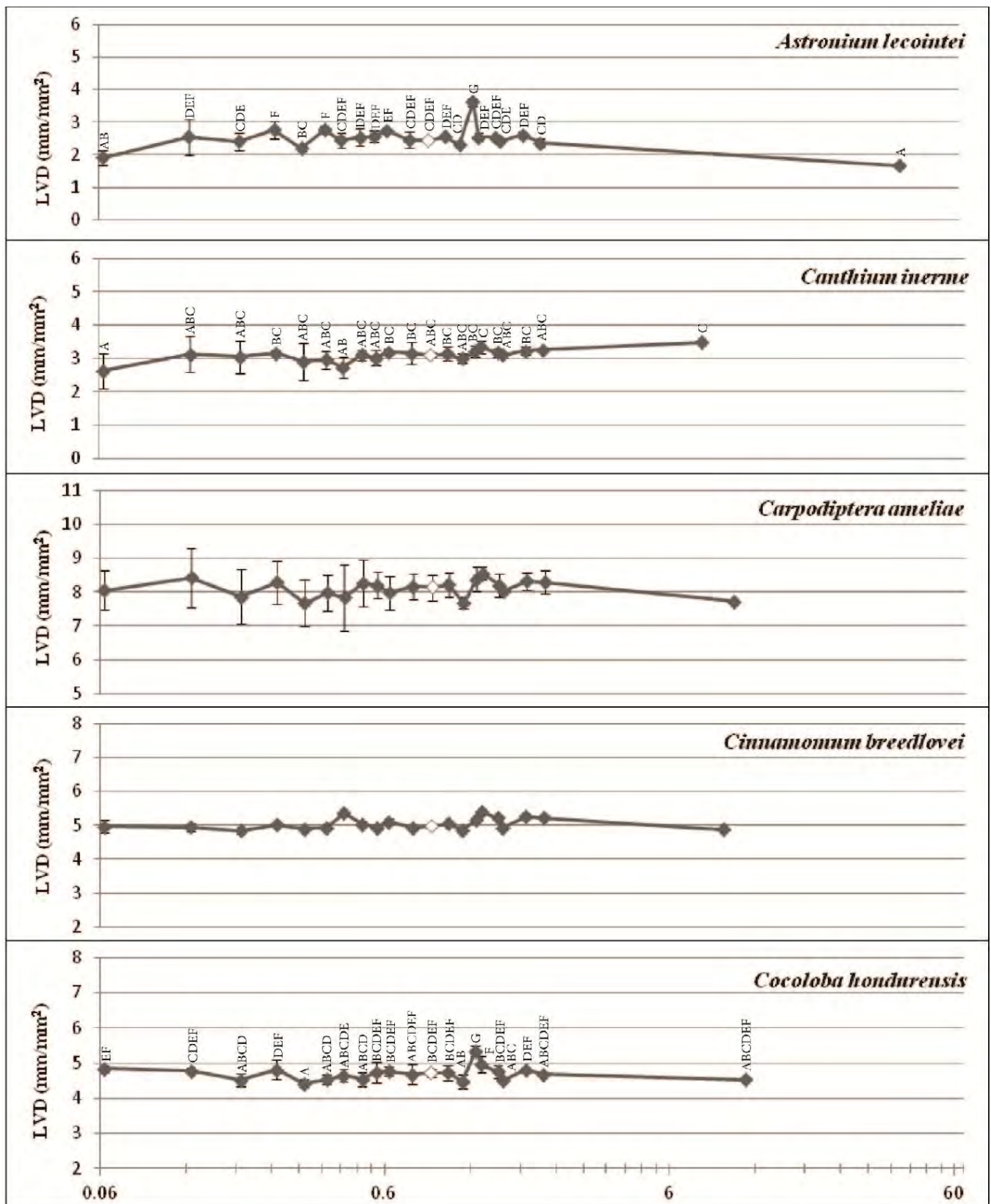


Fig. 21: Gráficas por especie de las LVD obtenidas en cada tamaño de área muestreada. En estas gráficas se pueden observar como las desviaciones van disminuyendo conforme las áreas son mayores. Punto en blanco perteneciente al área de 0.875 mm².

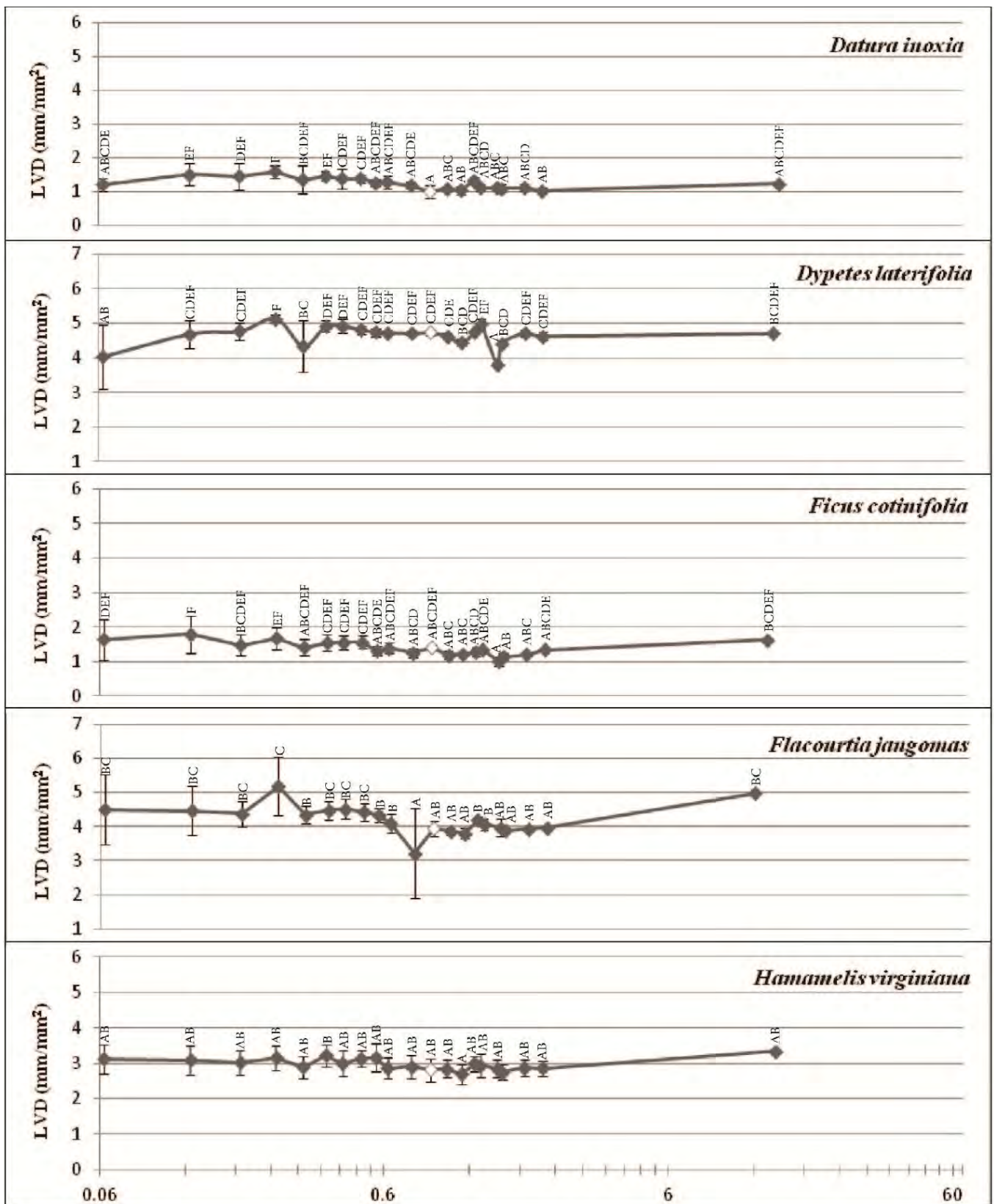


Fig. 21: Continuación.

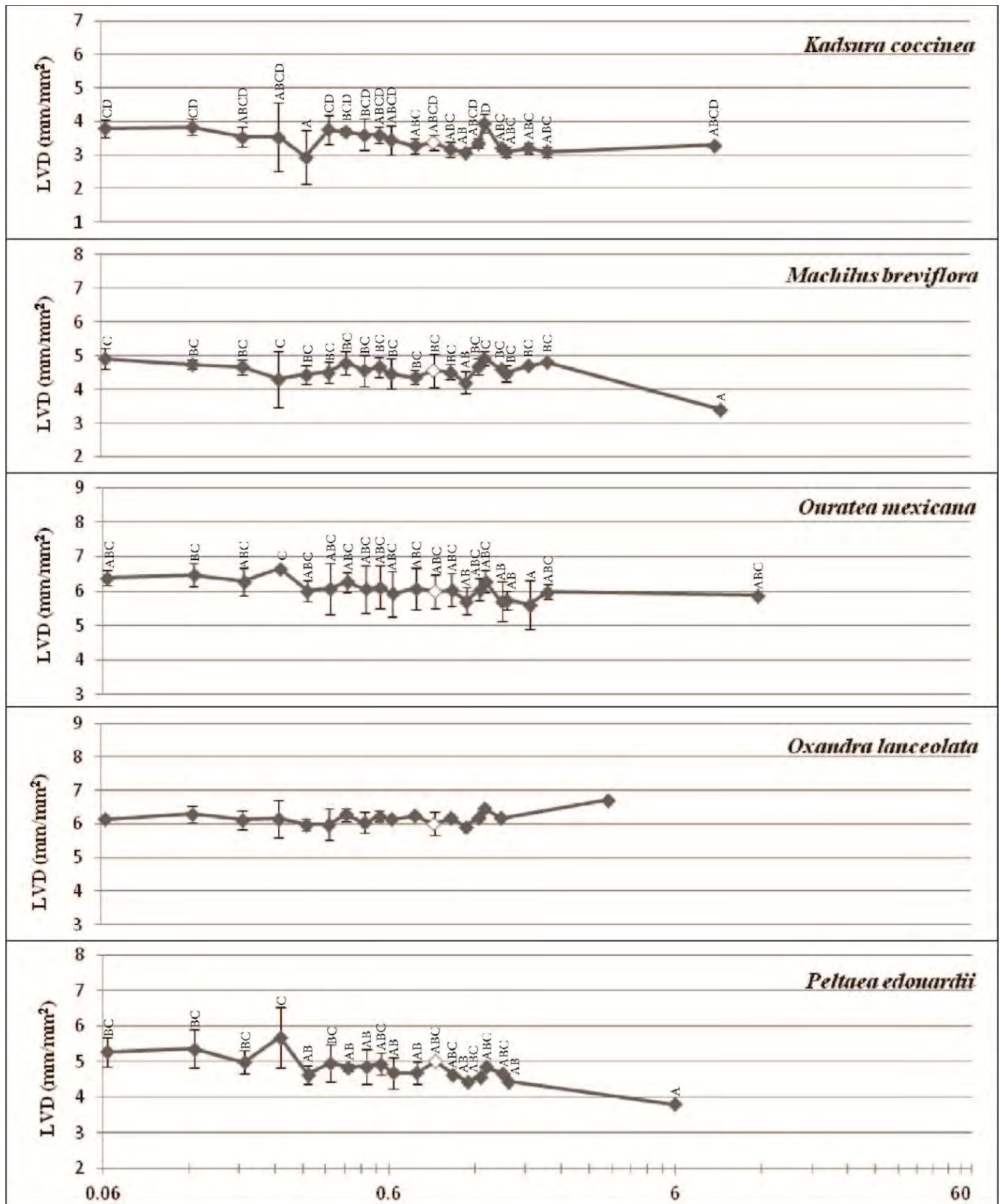


Fig. 21: Continuación

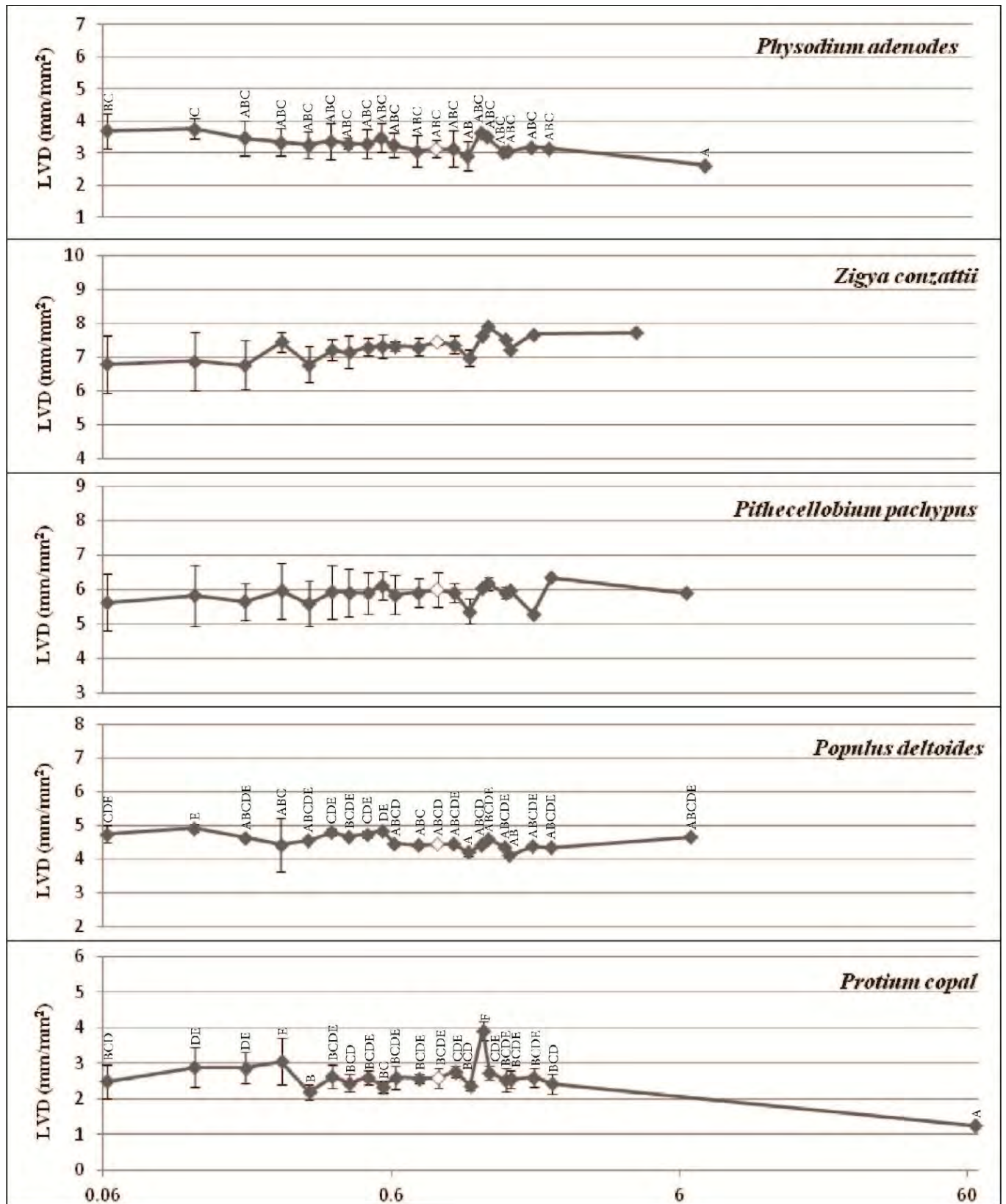


Fig. 21: Continuación

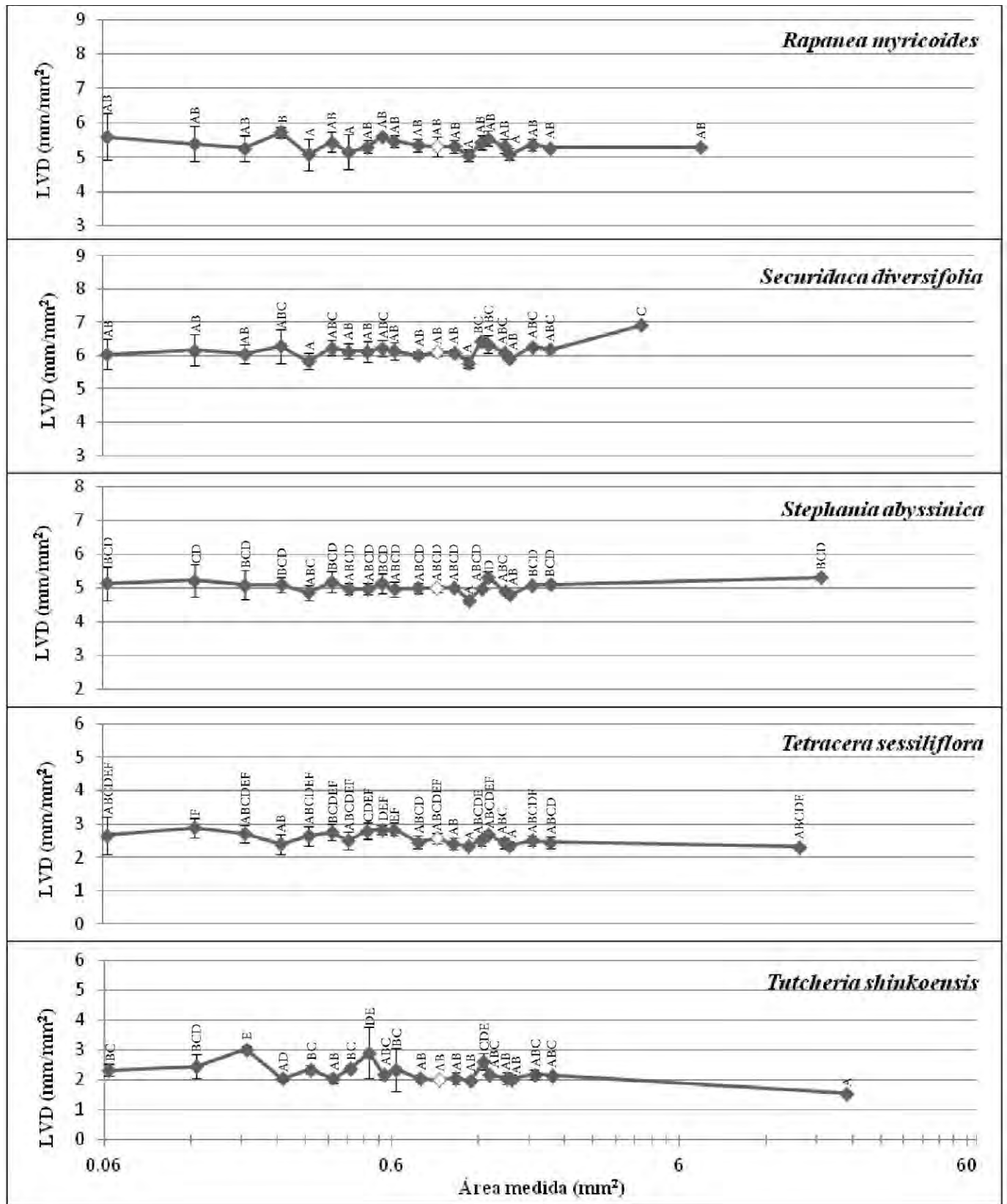


Fig. 21: Continuación

6.4. Análisis de altos órdenes de venación

Las mediciones de LVD considerando todas las venas fue significativamente mayor que la LVD de las imágenes en las que no se consideraron los órdenes de venación altos ($W=3.255$, $gl=24$, $P=0.001$) (Fig. 22). Estas diferencias fueron de 0.219 mm/mm^2 en las hojas marcadas (Fig. 13A y B) y de 0.342 mm/mm^2 en las imágenes que sólo presentan las venas (Fig. 13C y D).

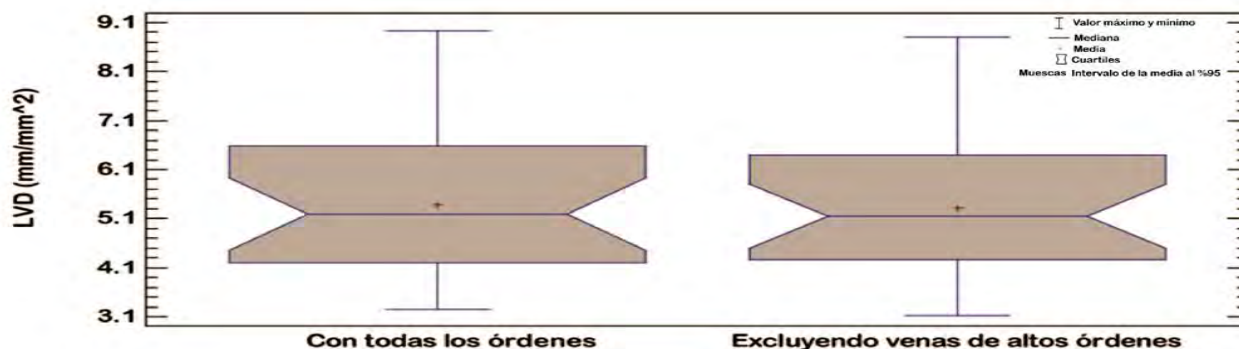


Fig. 22: Gráfica comparativa de las LVD del análisis de órdenes de venación, usando las imágenes con las venas marcadas sin hoja original de fondo tomando en cuenta todas las venas y eliminando las venas de órdenes mas bajos. Se puede ver que hay diferencia significativa entre los valores. ($W=3.225$, $gl=24$, $P=0.001$)

6.5. Análisis de ruido

En cuanto al ruido se encontraron diferencias significativas entre las mediciones de hojas con y sin ruido. Los valores de LVD obtenidos para las hojas medidas sin ser procesadas fueron mayores que los valores obtenidos para las imágenes en las que se eliminó el ruido antes de ser medidas ($W=4.271$, $gl=24$, $P=0.001$) (Fig. 23). Siendo el valor de LVD más bajo de 1.586 mm/mm^2 , mientras que en los casos de las hojas con ruido se obtuvieron siempre los valores de LVD más altos, encontrando su límite superior en 9.334 mm/mm^2 .

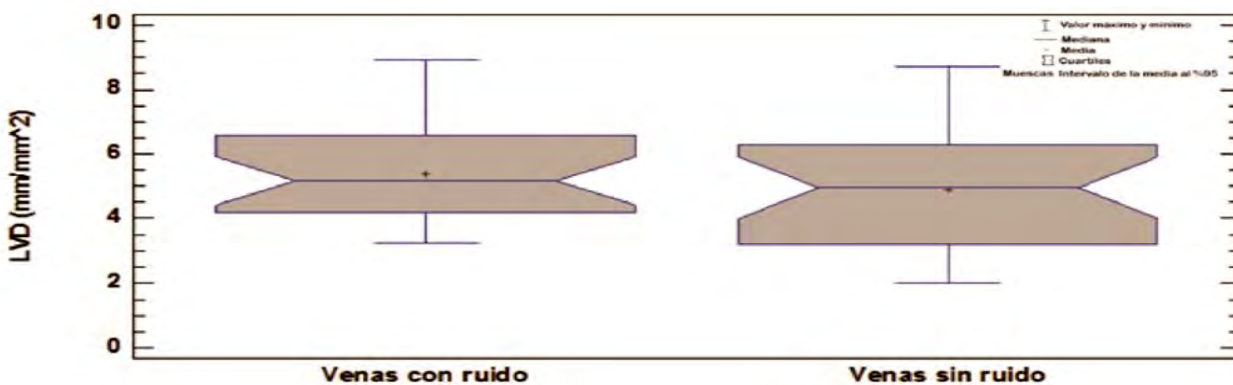
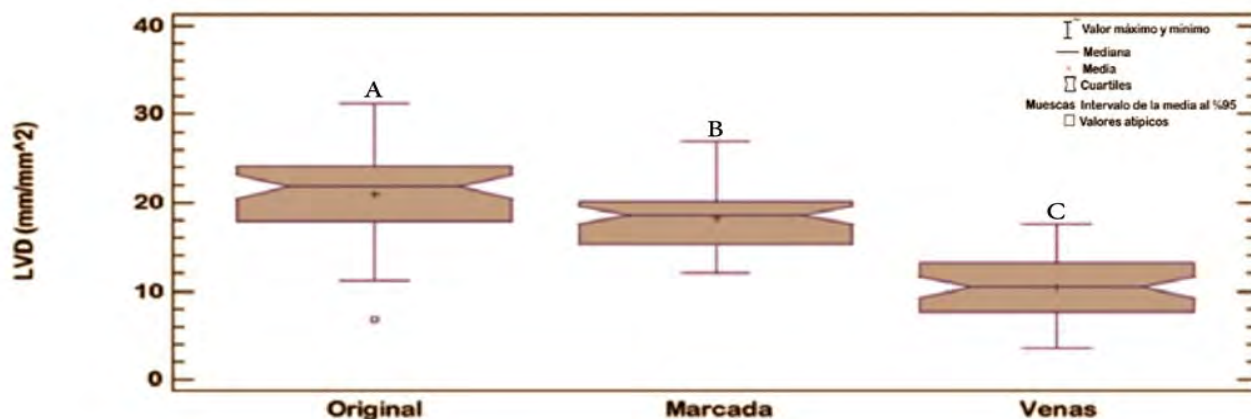


Fig. 23: Gráfica comparativa de las LVD obtenidas del análisis de ruido, usando las imágenes con las venas marcadas a las que se les eliminó la hoja original de fondo, medidas de forma directa y eliminando el ruido. Se observan diferencias significativas. ($W=4.271$, $gl=24$, $P=0.001$)

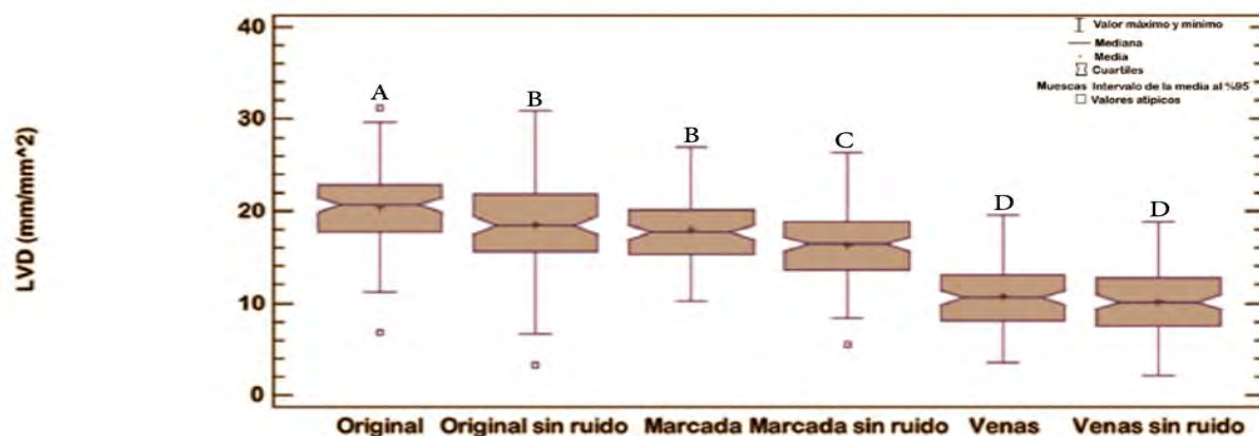
6.6. Análisis de tipos de marcaje en fósiles

En los fósiles, al igual que las hojas actuales, se observaron diferencias significativas mayores en las LVD de las imágenes originales (Fig. 6A y 15A) y las marcadas con la hoja de fondo (Fig. 6B y 15B), con respecto a las imágenes que sólo tenían las venas marcadas (Fig. 6C y 15C). Se obtuvieron LVD más altas para las hojas originales y menores en las imágenes de venas marcadas sin la hoja original de fondo ($H=174.457$, $gl=99$, $P=0.001$) (Fig. 24).



6.7. Análisis de ruido en fósiles

En este análisis también se obtuvieron los mismos resultados que en el análisis de ruido en hojas actuales (Sección 6.5). Las LVD mostraron diferencias significativas en todos los tratamientos, siendo mayores los valores de las imágenes a las que no se les eliminó el ruido ($W=8.68$, $gl=99$, $P=0.001$) (Fig. 25).



6.8. Comparación de la LVD de hojas actuales y fósiles

Al comparar las densidades de venación de dos de las hojas fósiles con hojas actuales de género afín, se encontró que los valores obtenidos en las hojas actuales son menores que los obtenidos en los fósiles, excepto en las imágenes de las venas marcadas (Fig. 9C y 15C) donde los valores de los fósiles resultaron ser menores (Tabla 3).

Tabla 3: Comparación de las LVD de hojas fósiles y hojas actuales.

	Zygia conzattii	Pithecellobium pachypus	Fósil 1 aff. <i>Pithecellobium</i>	Fósil 2 aff. <i>Pithecellobium</i>
Original	7.525	7.007	11.283	18.313
Marcada	7.793	6.957	8.094	11.431
Venas	7.664	6.638	5.822	4.354

6.9. Comparación de las LVD de ambas localidades fosilíferas

En cuanto a las LVD en ambas localidades, se encontró que no existen diferencias significativas entre San Esteban Tizatlán e Ixtapa ($U=1195$, $gl=49$, $P=0.707$) (Fig. 26). Se pudo observar que los valores de LVD se encontraban en un rango de 3.791 mm/mm² a 18.843 mm/mm² y medidas en promedio de 10.488 mm/mm² en la localidad de San Esteban Tizatlán, Tlaxcala, y de 3.231 mm/mm² a 17.524 mm/mm² con medidas en promedio de 10.06 mm/mm² en Ixtapa, Chiapas.

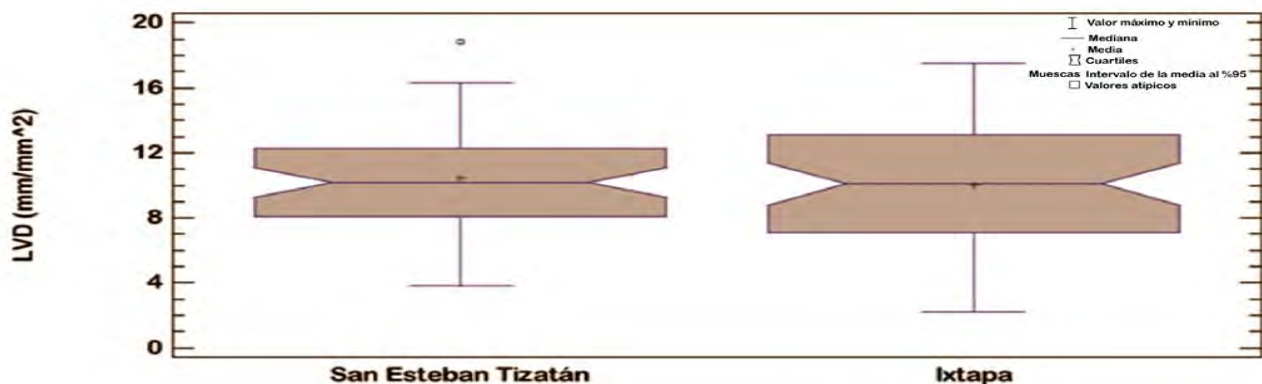


Fig. 26: Gráfica comparativa de las LVD de las hojas de ambas localidades fosilíferas. No se observan diferencias significativas. ($U=1195$, $gl=49$, $P=0.707$)

7. DISCUSIÓN

7.1. Análisis de tipos de marcaje

Con la finalidad de evaluar si el tipo de marcaje influye en la medición de la LVD, se compararon las mediciones de cada tipo de imagen. Con la prueba de Kruskal-Wallis, podemos ver que sí hay diferencias significativas entre la hoja original (Fig. 6A) y la hoja marcada (Fig. 6B). Durante el marcado de las imágenes fue evidente que al marcar las venas en la fotografía de la hoja, se debe de ser muy cuidadoso y objetivo al discernir si lo que se observa es una vena o no ya que el procesamiento de la hoja o alguna sombra llegan a confundirnos y se puede llegar a marcar un grupo de puntos o píxeles más oscuros en la imagen como si fueran una vena, lo que estaría incorporando un error en futuras mediciones.

7.2. Análisis de zona de medición

En la literatura consultada, se observó que es recomendable que para la mayoría de los estudios de hojas se hagan las observaciones y mediciones en la parte central de la lámina (Ellis *et al.*, 2009). En las muestras de hojas fósiles es poco común que se encuentren hojas completas y bien preservadas, y muchas veces se encuentran fragmentos muy bien preservados pero no se sabe con qué parte de la lámina se está trabajando. Esta falta de información que ofrecen las hojas incompletas pero bien preservadas es la principal razón del interés en comprobar si las mediciones de la LVD son significativamente diferentes entre las zonas de las hojas muestreadas.

Además de analizar las diferencias en la LVD de forma vertical (ápice, mitad y base), nos cuestionamos si la diferencia en los patrones de venación de los bordes, que presentan algunas hojas, ocasiona diferencias en las mediciones de LVD. Se obtuvieron valores con diferencias promedio de 0.02 mm/mm^2 entre el valor menor y el mayor de cada grupo de muestras del centro y del borde. Con las pruebas de Wilcoxon, se encontraron diferencias significativas en 9 especies (Tabla 1). Se puede observar que 4 de las 9 especies muestran marcada asimetría de la lámina, mientras que las otras 5 son simétricas, pero se pueden notar algunas diferencias en las venaciones a ambos lados de la vena media. Estas asimetrías y diferencias de las venaciones pueden estar causando diferencias al medir la LVD. Al observar la gráfica de todos los valores (Fig. 20) las medias son muy parecidas y las diferencias entre los valores de cada especie son mucho menores de 0.8 mm/mm^2 . Teniendo en cuenta que entre especies se encuentran diferencias de alrededor de 6 mm/mm^2 . Existen diferencias que pueden llegar a ser

significativas, pero comparadas con las diferencias de LVD medidas entre las especies no son tan importantes.

Se puede ver que las medias no son iguales en todas las zonas de la lámina. Es notorio que si comparamos las LVD de las zonas de la lámina con la LVD de la lámina completa la parte media tiende a ser más baja y en el ápice y base más alta. Por eso, para evitar meter datos que causen conflictos en los estudios, es recomendable tratar de no utilizar muestras que sean evidentemente del borde de la lámina y hacer un poco de esfuerzo por recabar material en el que estemos más seguros que se está midiendo la parte interna de la lámina, tanto en fósiles como en hojas actuales.

7.3. Análisis de área

En el análisis de zona de marcado se observó que no hay diferencias significativas en cuanto al lugar del que se tome la muestra de la lámina, pero se pueden apreciar diferencias significativas entre los datos obtenidos al hacer las mediciones en un cm^2 de lámina y hacerlo en toda la lámina. Por lo anterior en este análisis se estudió si el tamaño de la muestra influye en los resultados de las mediciones de LVD (mm/mm^2) y si hay alguna área óptima para hacer la cuantificación de LVD.

Al comparar la LVD obtenidas en las diferentes áreas, encontramos que en algunas especies existen diferencias significativas y en otras no hay diferencia (Tabla 2). Analizando las desviaciones estándar de los valores tomados de cada área por especie (Fig. 21), se puede observar que en las áreas cercanas a 0.8 mm^2 la desviación de los valores disminuye. Entonces, como casi nunca es posible tener la hoja fósil completa y con la venación preservada en su totalidad, es recomendable que se tomen muestras de por lo menos 0.8 mm^2 y que cuando se hagan estudios comparativos, el tamaño de área medida sea constante en todas las muestras usadas para las comparaciones. Esto además de dar precisión a los análisis, el usar áreas de hojas relativamente pequeñas, acorta el tiempo de procesamiento de la imagen por parte del programa Leaf Gui.

7.4. Análisis de altos órdenes de venación

Estudios previos han demostrado que los cambios en la LVD se observan principalmente en los órdenes de venación mayores (Sack y Scoffoni, 2013; Blonder y Equist, 2014). Es por esto que se decidió realizar un análisis que demostró las diferencias en las mediciones de LVD contemplando todos los órdenes de venación (Fig. 10A y 10C) y en muestras que no contemplaban los órdenes de venación primario, secundario y terciario (Fig. 10B y 10D).

Con este análisis, se pudo observar que existen diferencias significativas entre las imágenes con todos los órdenes de venación (Fig. 13A y C) y las imágenes que no presentan los órdenes de venación primario, secundario y terciario (Fig. 13B y D). Diferenciar y eliminar los órdenes de venación primarios, secundarios y terciarios implica bastante tiempo y esfuerzo. Además, al eliminar algunos órdenes de venación puede llevar a una mala interpretación de los órdenes de venas restando información importante. Esto lleva a que la diferencia de 0.3 mm/mm^2 (Fig. 22) no sea una diferencia tan significativa comparada con los problemas que conlleva el eliminarlos (ej. perder venas de interés o la disminución del tamaño de muestra).

7.5. Análisis de ruido

Teóricamente, la existencia de ruido en la imagen, debe provocar que las mediciones de la LVD (mm/mm^2) sean más altas. El programa Leaf Gui incluye este procedimiento como un método para separar la lámina de objetos que puedan contrastar con el fondo. En este análisis se puso a prueba si los valores de la LVD son menores al eliminar el ruido y se cuantificó la diferencia observada en los resultados. Después de realizar las mediciones se observaron diferencias significativas entre las hojas con y sin ruido (Fig. 23). Es importante resaltar que nuestros resultados sugieren que los valores de LVD se ven aumentados cuando no se elimina el ruido en las imágenes de hojas actuales aclaradas. Por lo anterior éste procedimiento será más importante al aplicarse en hojas fósiles. En casos en que las venas no son tan contrastantes y cuando las imágenes tienen zonas muy oscuras (ejem. sombras) o el sedimento no es de color homogéneo, los píxeles del sedimento pueden ser registrados como píxeles de interés y estar modificando nuestras mediciones de LVD (Fig. 8).

7.6 Análisis de tipos de marcado en fósiles

En las hojas actuales se tiene la ventaja de que es posible trabajar con hojas sometidas al proceso de aclarado. Esto nos permite observar con mayor facilidad las venas aunque no se elimine totalmente el mesófilo de la lámina. En hojas fósiles es difícil obtener una imagen en la que se resalten las venas en su totalidad. Lo anterior, sumado a la matriz de roca sedimentaria que tiene bastante textura y no posee un color homogéneo, provoca que sea más complicado para Leaf Gui identificar los píxeles de las venas. La imagen que se obtiene después de que Leaf Gui realiza el thresholding de las fotos originales de las hojas fósiles es muy borrosa, y en muchos casos no se pueden identificar las venas. Es por esto, que se examinó si hay diferencias en las mediciones de hojas fósiles al realizar el

marcado de las venas. En este análisis y como se esperaba, se puede ver que existen diferencias significativas entre los diferentes tipos de marcado y que éstas son más evidentes que en las hojas actuales aclaradas (Fig. 24).

Los resultados de LVD en el análisis de tipo de marcado en fósiles fueron muy variables con diferencias en promedio de 18 mm/mm^2 entre los valores más altos que siempre se obtuvieron en las hojas originales (Fig. 15A) y los más bajos que fueron resultado de las imágenes de las venas (Fig. 15C). De igual forma, al realizar el marcado de las venas se obtuvo una imagen más definida y como es lógico, al retirar la imagen de fondo y dejar sólo la imagen de las venas marcadas con el thresholding se lograba una imagen totalmente definida de las venas (Fig. 27). Lo anterior demuestra que lo mejor para medir densidades de venación es utilizar las imágenes de las venas. Esto evita que las diferentes coloraciones del sedimento aumenten los valores y al momento de hacer el thresholding se obtengan imágenes de las venas más definidas.

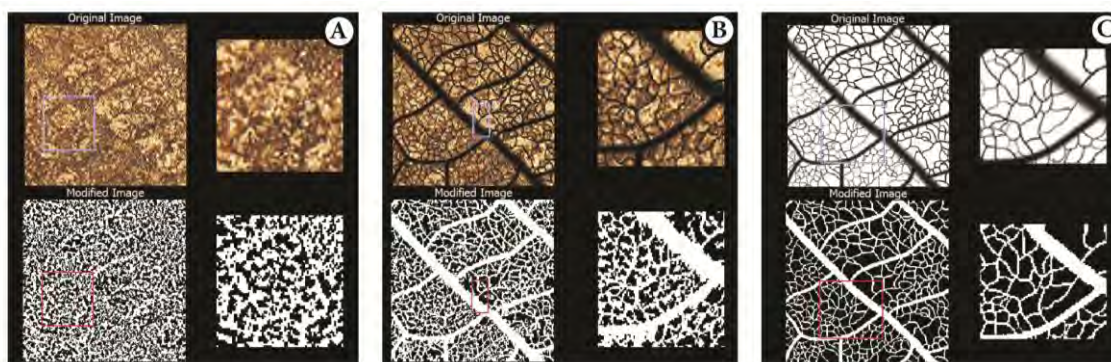


Fig. 27: Ejemplo de imágenes de hojas fósiles después del thresholding. A. Hoja original; B. Hoja original con las venas marcadas; C. Venas marcadas sin hoja original de fondo.

7.7. Análisis de ruido en fósiles

Las imágenes de las venas marcadas (Fig. 15C) presentaron mediciones de LVD más bajas en comparación a las otras dos imágenes. Estos resultados pueden deberse a que el ruido causado por zonas de la matriz de roca que presentan el mismo tono de las venas, están incrementando los valores en la medición. Entonces, se quiso saber cuánto están aumentando los valores por el ruido. Se encontró que estos píxeles que se toman como venas y que no permiten definir la imagen después del thresholding, afectan bastante la medición de LVD en la hoja. Al comparar las gráficas de las LVD se aprecia que la diferencia de las medias de los valores de las LVD con y sin ruido es mayor en las hojas originales y mucho menor en las imágenes de las venas (Fig. 25). Por otro lado, si se observan las imágenes obtenidas del thresholding, en las hojas originales (Fig. 15A), aun tratando de eliminar el

ruido, la imagen no se define, y es complicado encontrar un parámetro que elimine bien los píxeles de fondo de la imagen sin afectar a los píxeles de las venas. La limpieza de la imagen se ve mejorada al remarcar las venas sobre la imagen original, pero tampoco fue posible limpiar totalmente la imagen de estos píxeles de fondo producidos por la matriz de roca. Finalmente en las imágenes de las venas marcadas (Fig. 15C), se logran eliminar de otra forma estos píxeles y se obtienen una imágenes donde solo se ven las venas de la hoja (Fig. 27). Lo anterior explica la enorme diferencia que obtuvimos en las mediciones de LVD.

7.8. Comparación de LVD de hojas actuales y fósiles

Este análisis corroboró que medir las imágenes de las venas (Fig. 9C y 15C) y eliminar el ruido de la imagen (Sección 5.6) permite hacer buenas mediciones de las LVD en hojas fósiles. Al comparar las hojas fósiles identificadas como *Pithecellobium* con sus representantes actuales, las LVD obtenidas son muy cercanas. Se encontró que los valores obtenidos en hojas actuales son menores que los obtenidos en los fósiles, excepto en las imágenes de las venas marcadas (Fig. 9A y 15A) en los que los valores en los fósiles fue menor. El que los valores de LVD en hojas fósiles resultara mayor en algunos casos, se debe a que el programa midió píxeles que no pertenecían a las venas. En el momento que se quitaron todos los píxeles que causaban ruido en la imagen de las hojas fósiles la LVD bajó. Lo anterior se puede corroborar con las hojas aclaradas actuales (*Zygia konzattii* y *Pithecellobium pachypus*), en las que las mediciones de LVD se mantuvieron relativamente constantes en todas las mediciones.

Es importante resaltar que el hacer las mediciones en imágenes que sólo contengan las venas marcadas (Fig. 9C y 15C) y eliminarles el ruido, permite realizar mediciones más precisas, aunque estas no dejan de mostrar error. Al usar las imágenes de venas marcadas (Fig. 9C y 15C), en el caso de las hojas actuales se obtuvieron valores de LVD menores que en las hojas fósiles. Es posible que las hojas fósiles nos arrojen valores menores por al menos tres posibles factores. El primer factor se atribuye a que en el proceso de fosilización las hojas pierden detalles en las venas, que al momento de marcar las venas y realizar el thresholding resulta en pérdida de venas y menores valores de LVD (Fig. 16). Otra posibilidad se basa en estudios que plantean que las hojas de las plantas han mostrado un decremento en la LVD al paso de los millones de años (Boyce, 2008). Se puede llegar a suponer que en 10 millones de años la LVD ha disminuido, pero para afirmar esto sería necesario realizar estudios más detallados. Por último el tercer factor es la disminución en la LVD como resultado de que las hojas

fósiles que se han identificado pertenecen al mismo género de hojas actuales con las que están comparando, pero no se puede asegurar que sean la misma especie. En realidad no se tiene el dato exacto de dónde provienen las hojas de *Pithecellobium pachipus* y *Zygia consattii*, pero se sabe que estos dos géneros se encuentran en los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Tamaulipas y Quintana Roo, así como de Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala y Honduras (www.tropicos.org), lugares que poseen climas de semicálidos a cálidos, siempre húmedos. Al encontrarse en climas muy parecidos al que se ha calculado para la localidad de San Esteban Tizatlán (Domínguez de la Torre, 2013), es posible que las diferencias en la LVD no sean debidas a diferencias en los ambientes. Sea cual sea la razón, aunque se nota una diferencia entre las LVD de las hojas fósiles y actuales la metodología que está proponiendo seguir ayuda a eliminar errores en la medición. En este caso solo resta mencionar que al seleccionar las zonas de las muestras es importante tener las zonas lo mejor preservadas y ser muy cuidadosos de marcar todas las venas.

7.9. Metodología propuesta para medir LVD en hojas fósiles

Al final, los 5 análisis realizados con hojas actuales (tipo de marcaje, zona de medición, área, ruido y altos ordenes de venación) y los 2 análisis con hojas fósiles (tipo de marcado y ruido), sugieren que la mejor manera de medir las hojas fósiles es con muestras de un área mayor a 0.8mm^2 . Este tamaño siempre debe mantenerse constante en los estudios, principalmente en los comparativos. Además es recomendable que estas áreas se encuentren lo más cercanamente posible al centro de la lámina y en zonas de la hoja donde estén bien preservadas las venas, cuando se trabaja con fósiles. Se deben utilizar las imágenes en las que cuidadosamente se han marcado todas las venas y se ha eliminado la hoja original del fondo (Fig. 9C y 15C), y al medir se debe eliminar el ruido usando las herramientas que provee el mismo programa Leaf Gui.

7.10. Comparación de la LVD de ambas localidades fosilíferas

Con los análisis anteriores se definieron algunos parámetros para la medición de LVD y fueron aplicados en este análisis para obtener las LVD de ambas localidades fosilíferas. No fue posible identificar diferencias significativas entre las LVD de ambas localidades. Esto puede deberse a que el tamaño de muestra aún es muy pequeño o a que en realidad no es posible observar diferencias como se esperaba. Graficando los valores (Fig. 26), se puede ver que en la localidad de Ixtapa a la que anteriormente por medio de CLAMP se le calculó un clima semifrío-húmedo con una temperatura de

8.86°C a 12.1°C y precipitación promedio anual de 1119.1 mm, y humedad relativa de 67.24% (Hernández-Villalva, 2012), presenta mediciones de LVD en un rango ligeramente más amplio que la localidad de San Esteban Tizatlán; localidad a la que se le calculó anteriormente y también haciendo uso de CLAMP un clima semicálido-húmedo con temperaturas que van de 17.2°C a los 26.19°C, una precipitación promedio anual de 693.8 mm y humedad relativa del 59.1% (Domínguez de la Torre, 2013).

La LVD puede verse influenciada por factores ambientales como son el suelo, la iluminación, la velocidad del viento y la disponibilidad de nutrientes, pero el factor que al parecer es más influyente en la LVD es la disponibilidad del agua (Uhl y Morsbrugger, 1999; Brodribb y Jordan, 2011; Zhu *et al.*, 2012, Carnis *et al.*, 2014). Factores ambientales que aumentan la transpiración de las plantas o disminuyen la disponibilidad de agua tienden a incrementar la LVD (Carnis *et al.*, 2014). Se piensa que los rasgos de las venas reflejan el intercambio de gas y agua entre las hojas y la atmósfera, lo que está influenciado por factores climáticos. Hojas con densidades de venación bajas están adaptadas a bajas demandas transpiracionales (Uhl y Mosbrugger, 1999; Roth-Nebelsick *et al.*, 2001; Boyce, 2008; Blonder y Enquist 2014; Zhu *et al.*, 2012).

Moles *et al.* (2014) analizaron la capacidad de los caracteres de las plantas para predecir temperatura y precipitación, llegando a la conclusión de que en general los caracteres de las plantas responden más a cambios de temperatura. En este análisis no se encontraron diferencias significativas entre los valores de LVD de ambas localidades, lo que lleva a pensar que en el caso específico de la LVD puede estar más relacionada con la humedad relativa en el ambiente o con la precipitación que con la temperatura. Esto es debido a que ambas localidades, según CLAMP, presentan una diferencia de aproximadamente de 11°C en la temperatura media anual, lo que debió mostrar diferencia en las venaciones, si ese fuera un factor que actuara sobre el carácter. Por otro lado, cabe la posibilidad de que los parámetros calculados por CLAMP, no sean realmente los parámetros que prevalecían en la localidad durante el Mioceno. CLAMP describe la fisionomía foliar de una forma más detallada que otras metodologías para la predicción de paleoclimas, por lo que se esperaría que los datos obtenidos fueran los más acertados, pero en realidad no es así. Diferentes autores (Wilf, 1997; Jordan, 1997; Gregory-Wodzicki, 2000) sugieren que la estimación de la temperatura media anual no es del todo exacta para localidades que se encuentran hacia el sur, debido a que existe sesgo en las colectas para las bases de datos. Esto es porque los muestreos para CLAMP abarcan un alto rango de vegetación de Norteamérica y dejan fuera muchas floras del sur que pueden responder de forma diferente. También,

de esta metodología propuesta por Wolfe (1993) es cuestionado que se puede estar agregando error al definir mal los caracteres en el material de estudio y se ha encontrado que en algunos casos existe poca o nula relación entre el clima y algunos estados de carácter usados (Wing y Greenwood, 1993; Stranks y England, 1997; Wilf, 1997, Kowalski, 2002; Uhl *et al.*, 2003; Peppe *et al.*, 2011).

Para San Esteban Tizatlán se propone la presencia de familias como Anacardiaceae (*Cyrtoarpa*), Fabaceae (*Abarema*, *Lonchocarpus*, *Pithecellobium* y *Zigya*) y Rhamnaceae (*Karwinskia* y *Rhamnus*) (Hernández-Damián, 2010; Domínguez de la Torre, 2013), vegetación encontrada en lugares tropicales y templados, lo que es congruente con los resultados obtenidos con CLAMP en 2012. En Ixtapa se han identificado afinidades a Dilleniaceae (*Tetracera*), Sapindaceae (*Acer* y *Serjania*), Fabaceae, Myrtaceae y Moraceae (Peralta-Medina, 2009; Hernández-Villava, 2012); géneros y familias que también corresponden a vegetación tropical. La vegetación tropical se caracteriza por una temperatura mayor a 18°C (www.inegi.org), lo cual no concuerda con la temperatura anual de 8.86°C a 12.1°C calculada, lo que lleva a pensar que las predicciones hechas para la localidad de Ixtapa no sean lo suficientemente cercanas a los valores que pudo presentar este sitio en el Mioceno.

Después de realizar la comparación de las localidades nos damos cuenta que todavía falta profundizar en el uso de la LVD como proxie paleoclimático. Si bien, ya es posible realizar mediciones de LVD comparables entre localidades fosilíferas, es necesario realizar estudios más detallados con hojas de especies actuales de localidades en las que se tenga bien estudiado el clima regional, para así poder crear correlaciones directas entre LVD y valores climáticos.

8. CONCLUSIÓN

La medición de la LVD es un tema en el que todavía se están desarrollando variadas metodologías que facilitan la obtención de datos. Hace falta adentrarnos más en el desarrollo explícito de éstas metodologías para poder unificarlas y para que sean más fácilmente aplicables. Principalmente cuando se trabaja con fósiles, se debe de ser muy cuidadoso en su estudio para poder llegar a buenas interpretaciones. En este trabajo se propone una nueva metodología que permite la medición de las LVD en hojas actuales y fósiles de forma más eficiente y sistematizada, lo que permite comenzar a investigar a la LVD como un carácter con potencial para ser usado como proxie paleoclimático.

Por medio de los análisis con hojas actuales aclaradas, se encontró que las muestras a las que se les quiera medir la LVD deben tener un área mayor a 0.8mm², que preferentemente no sea tomada de los bordes de la lámina, estar representadas en una imagen donde sólo aparezcan las venas, las cuales

deben ser marcadas cuidadosamente para no excluir información valiosa evitando marcar venas inexistentes y aplicar la metodología del programa Leaf Gui para eliminar el ruido de la imagen. Esto permite disminuir el error en las mediciones y que éstas sean más constantes sin importar el tamaño y la zona de la lámina con la que se trabaje.

Una vez obtenidos los valores de LVD en hojas actuales, mismos que se compararon con las LVD de las hojas fósiles con mayor afinidad morfológica, se comprobó que los parámetros definidos anteriormente eran los más adecuados para la obtención de la LVD con el programa Leaf Gui. Sólo se agrega que en fósiles es pertinente seleccionar el área de la hoja mejor preservada mayor a 0.8mm^2 y siempre aplicar la metodología de Leaf Gui para eliminar el ruido de la imagen. Aunque los parámetros para obtener las mediciones de LVD parecen ser difíciles de encontrar, no son requisitos muy rigurosos para localidades que ya han sido trabajadas y de las que ya se tiene cierta información que nos lleve a realizar estudios más detallados como son la interpretación de paleoambientes y paleoclimas.

En cuanto a la utilidad de la LVD como proxy paleoclimático, se esperaba obtener resultados más concluyentes. Sólo se pudo observar que sigue existiendo la posibilidad de que éste carácter tenga funcionalidad para indicar climas, pero no con diferencias altamente marcadas en las mediciones como se esperaba, sino mostrando rangos de densidades más estrechos o más amplios (San Esteban: 6.45 a 15.79 mm/mm^2 ; Ixtapa: 2.2 a 17.52 mm/mm^2), según las condiciones en que se encontraban las localidades. Si bien no se puede asegurar que el carácter es funcional, ahora que ya se cuenta con la metodología y haciendo estudios más amplios y detallados se podrá encontrar alguna correlación entre los parámetros climáticos y ambientales con las densidades de venas de una manera más precisa.

Existe la posibilidad de que la LVD no esté ligada a la temperatura, pero la literatura apunta a que la precipitación sí es un factor altamente influyente en las densidades de venación de las hojas (Uhl y Mosbrugger, 1999). Dado esto y con la presente metodología establecida para la medición de densidades de venas, se puede proporcionar un nuevo carácter que permitirá robustecer las metodologías usadas para el cálculo de paleoclimas y climas en general.

9. LITERATURA CITADA

1. Ballesteros-Barera, C. y Rodríguez-Ramírez, A. (2011). Métodos de reconstrucción paleoclimática. En Sánchez-Rojas G., Ballesteros-Barrera, G. y Pavón N. P. (Ed.) *Cambio climático: Aproximaciones para el estudio de su efecto sobre la biodiversidad* (1-10). Pachuca, Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
2. Blonder, B., Violle, C., Bentley, L. P., y Enquist, B. J. (2014). Inclusion of vein traits improves predictive power for the leaf economic spectrum: a response to Sack *et al.* (2013). *Journal of experimental botany*, 65(18), 5109-5114.
3. Blonder, B., y Enquist, B. J. (2014). Inferring climate from angiosperm leaf venation networks. *New Phytologist*, 204(1), 116-126.
4. Bohn, S., Andreotti, B., Douady, S., Munzinger, J., y Couder, Y. (2002). Constitutive property of the local organization of leaf venation networks. *Physical Review E*, 65(6), 061914.
5. Boyce, C. K. (2010). The evolution of plant development in a paleontological context. *Current opinion in plant biology*, 13(1), 102-107.
6. Boyce, C. K. (2008). The fossil record of plant physiology and development: what leaves can tell us. *Paleontol. Soc. Papers*, 14, 133-146.
7. Boyce, C. K. (2009). Seeing the forest with the leaves—clues to canopy placement from leaf fossil size and venation characteristics. *Geobiology*, 7(2), 192-199.
8. Boyce, C. K., Brodribb, T. J., Feild, T. S., y Zwieniecki, M. A. (2009). Angiosperm leaf vein evolution was physiologically and environmentally transformative. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1663), 1771-1776
9. Boyce, C. K., y Zwieniecki, M. A. (2012). Leaf fossil record suggests limited influence of atmospheric CO₂ on terrestrial productivity prior to angiosperm evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10403-10408.
10. Brodribb, T. J., Feild, T. S., y Jordan, G. J. (2007). Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant Physiology*, 144(4), 1890-1898
11. Brodribb, T. J., y Jordan, G. J. (2011). Water supply and demand remain balanced during leaf acclimation of *Nothofagus cunninghamii* trees. *New Phytologist*, 192(2), 437-448.

12. Carins, M. R., Jordan, G. J., y Brodribb, T. J. (2014). Acclimation to humidity modifies the link between leaf size and the density of veins and stomata. *Plant, cell & environment*, 37(1), 124-131.
13. Cevallos-Ferriz, S. R. S. y Calvillo-Canadell, L. (2012). *La historia que cuentan las plantas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
14. Cevallos-Ferriz, S. R., González-Torres, E. A., y Calvillo-Canadell, L. (2012). Perspectiva paleobotánica y geológica de la biodiversidad en México. *Acta botánica mexicana*, (100), 317-350.
15. Chaloner, W. G. y Creber, G. T. (1990). Do fossil plants give a climatic signal?. *Journal of the Geological Society*, 147(2), 343-350.
16. Das, A., Bucksch, A., Price, C. A., y Weitz, J. S. (2014). ClearedLeavesDB: an online database of cleared plant leaf images. *Plant methods*, 10(8).
17. DE, B., y MEXICANA, S. G. (2007). Evolución geológica del sureste mexicano desde el Mesozoico al presente en el contexto regional del Golfo de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 59(1), 19-42.
18. Dengler, N., & Kang, J. (2001). Vascular patterning and leaf shape. *Current opinion in plant biology*, 4(1), 50-56.
19. Dhondt, S., Van Haerenborgh, D., Van Cauwenbergh, C., Merks, R. M., Philips, W., Beemster, G. T., y Inzé, D. (2012). Quantitative analysis of venation patterns of Arabidopsis leaves by supervised image analysis. *The Plant Journal*, 69(3), 553-563.
20. Dominguez-de la Torre, A. (2013). *Reconstrucción paleoclimática con base en la diversidad foliar del mioceno de San Esteban Tizatlán Tlaxcala, México*. Tesis de licenciatura no publicada, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
21. Ellis, B., D. C. Daly, L. J. Hickey, J. D. Mitchell, K. R. Johnson, P. Wilf y S. L. Wing. (2009). *Manual of leaf architecture*. Nueva York, Estados Unidos. The New York Botanical Garden Press.
22. Ferrari, L., Conticelli, S., Vaggelli, G., Petrone, C. M., y Manetti, P. (2000). Late Miocene volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics*, 318(1), 161-185.
23. Ferrusquía-Villafranca, I. (1996), Contribución al conocimiento geológico de Chiapas - el área de Ixtapa-Soyaló. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología, Boletín, 109, 1-130

24. Feild, T. S., Brodribb, T. J., Iglesias, A., Chatelet, D. S., Baresch, A., Upchurch, G. R., ... y Jaramillo, C. (2011). Fossil evidence for Cretaceous escalation in angiosperm leaf vein evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), 8363-8366.
25. Georgia Institute of Technology Research News (Enero 2011) Improving plants: New software quantifies leaf venation networks, enables plant biology advances. *ScienceDaily*. Revisado el 5 de diciembre del 2014. Obtenido de www.sciencedaily.com/releases/2011/01/110113131431.htm
26. Greenwood, D. R. (2007). Fossil angiosperm leaves and climate: from Wolfe and Dilcher to Burnham and Wilf. *COURIER-FORSCHUNGSINSTITUT SENCKENBERG*, 258, 95.
27. Gregory-Wodzicki, K. M. (2000). Relationships between leaf morphology and climate, Bolivia: implications for estimating paleoclimate from fossil floras. *Journal Information*, 26(4).
28. Hernández-Damián, A. L. (2010). *Diversidad foliar en el mioceno de San Esteban Tizatlán, Tlaxcala*. Tesis de licenciatura no publicada, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
29. Hernández-Villalva, D. (2012). *Inferencia paleoclimática de la formación miocénica en Ixtapa, Chiapas, usando la fisionomía foliar de los fósiles*. Tesis de licenciatura no publicada. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
30. Hickey, L. J. (1973). Classification of the architecture of dicotyledonous leaves. *American Journal of Botany*, 17-33.
31. Huff, P. M., Wilf, P., y Azumah, E. J. (2003). Digital future for paleoclimate estimation from fossil leaves? Preliminary results. *Palaios*, 18(3), 266-274.
32. Inegi, (1981). Síntesis geográfica de Tlaxcala, México. Coordinación General de los Servicios Nacionales de Estadística, Geografía e Informática. p. 13
33. Jordan, G. J. (1997). Uncertainty in palaeoclimatic reconstructions based on leaf physiognomy. *Australian Journal of Botany*, 45(3), 527-547.
34. Jordan, G. J. (2011). A critical framework for the assessment of biological palaeoproxies: predicting past climate and levels of atmospheric CO₂ from fossil leaves. *New Phytologist*, 192(1), 29-44.
35. Kapur, J. N., Sahoo, P. K., y Wong, A. K. (1985). A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer vision, graphics, and image processing*, 29(3), 273-285.

36. Kowalski, E. A. (2002). Mean annual temperature estimation based on leaf morphology: a test from tropical South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 188(3), 141-165.
37. Little, S. A., Kembel, S. W., y Wilf, P. (2010). Paleotemperature proxies from leaf fossils reinterpreted in light of evolutionary history. *PLoS One*, 5(12), e15161.
38. Manchester, S. R., y Tiffney, B. H. (2001). Integration of paleobotanical and neobotanical data in the assessment of phytogeographic history of holarctic angiosperm clades. *International Journal of Plant Sciences*, 162(S6), S19-S27.
39. Martínez-Nistal 2001. Bases Teóricas, Digitalización y Análisis de imágenes. En: Ferreres, L. A., Rojo, M. G., y Gil, A. M. P. (Eds.). (2001). *Manual de telepatología*. SEAP (Patología).
40. Martínez-Nistal, Á., & Sampedro, A. (1995). Introducción al Proceso Digital de Imágenes. En: Sampedro, A., De los Toyos, J. R. y Matínez-Nistal, A. (Ed.). (31-47). Oviedo, España: Universidad de Oviedo.
41. McElwain, J. C., Willis, K. J., y Lupia, R. (2005). Cretaceous CO₂ decline and the radiation and diversification of angiosperms. In *A history of atmospheric CO₂ and its effects on plants, animals, and ecosystems* (pp. 133-165). Springer New York.
42. McKown, A. D., Cochard, H., y Sack, L. (2010). Decoding leaf hydraulics with a spatially explicit model: principles of venation architecture and implications for its evolution. *The American Naturalist*, 175(4), 447-460.
43. McKown, A. D., y Dengler, N. G. (2009). Shifts in leaf vein density through accelerated vein formation in C4 Flaveria (Asteraceae). *Annals of botany*, 104(6), 1085-1098.
44. Moles, A. T., Perkins, S. E., Laffan, S. W., Flores-Moreno, H., Awasthy, M., Tindall, M. L., ... y Bonser, S. P. (2014). Which is a better predictor of plant traits: temperature or precipitation?. *Journal of vegetation science*, 25(5), 1167-1180.
45. Molinas, M., y Campos, M. (1993). Aplicación del análisis digital de imágenes al estudio de la calidad del corcho. En *Congresos Forestales*.
46. Pagano, M., & Storchi, P. (2015). Leaf Vein Density: A Possible Role as Cooling System. *Journal of Life Sciences*, 9, 299-303.

47. Peppe, D. J., Royer, D. L., Cariglino, B., Oliver, S. Y., Newman, S., Leight, E., ... y Wright, I. J. (2011). Sensitivity of leaf size and shape to climate: global patterns and paleoclimatic applications. *New Phytologist*, 190(3), 724-739.
48. Peralta-Medina, E. (2009). *Arquitectura foliar de hojas fósiles de Ixtapa, Chiapas, México*. Tesis de licenciatura no publicada, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
49. Photoshop C6v(Versión 13.0 x64) [Software].1990-2012
50. Porras-Carasco, A. (2011). *Técnicas para la extracción de cutículas fósiles*. Tesis de licenciatura no publicada Facultad de Ciencias, UNAM, México.
51. Price, C. A. (2012). LEAF GUI: analyzing the geometry of veins and areoles using image segmentation algorithms. En *High-throughput phenotyping in plants* (pp. 41-49). Humana Press.
52. Price, C. A., Symonova, O., Mileyko, Y., Hilley, T., y Weitz, J. S. (2011). Leaf extraction and analysis framework graphical user interface: segmenting and analyzing the structure of leaf veins and areoles. *Plant Physiology*, 155(1), 236-245.
53. Price, C. A., Wing, S., & Weitz, J. S. (2012). Scaling and structure of dicotyledonous leaf venation networks. *Ecology letters*, 15(2), 87-95.
54. Price, C. A., Munro, P. R., y Weitz, J. S. (2014). Estimates of leaf vein density are scale dependent. *Plant physiology*, 164(1), 173-180.
55. Rasband, W.S. (1997-2014). ImageJ (Versión 1.47v). U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>.
56. Rolland-Lagan, A. G., Amin, M., y Pakulska, M. (2009). Quantifying leaf venation patterns: two-dimensional maps. *The Plant Journal*, 57(1), 195-205.
57. Roth-Nebelsick, A., Uhl, D., Mosbrugger, V., y Kerp, H. (2001). Evolution and function of leaf venation architecture: a review. *Annals of Botany*, 87(5), 553-566.
58. Royer, D. L., y Wilf, P. (2006). Why do toothed leaves correlate with cold climates? Gas exchange at leaf margins provides new insights into a classic paleotemperature proxy. *International Journal of Plant Sciences*, 167(1), 11-18.
59. Royer, D. L., Meyerson, L. A., Robertson, K. M., y Adams, J. M. (2009). Phenotypic plasticity of leaf shape along a temperature gradient in *Acer rubrum*. *PLoS One*, 4(10), e7653.

60. Russo, S. E., Cannon, W. L., Elowsky, C., Tan, S., y Davies, S. J. (2010). Variation in leaf stomatal traits of 28 tree species in relation to gas exchange along an edaphic gradient in a Bornean rain forest. *American Journal of Botany*, 97(7), 1109-1120.
61. Sack, L., y Frole, K. (2006). Leaf structural diversity is related to hydraulic capacity in tropical rain forest trees. *Ecology*, 87(2), 483-491.
62. Sack, L., Dietrich, E. M., Streeter, C. M., Sánchez-Gómez, D., y Holbrook, N. M. (2008). Leaf palmate venation and vascular redundancy confer tolerance of hydraulic disruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5), 1567-1572.
63. Sack, L., y Scoffoni, C. (2013). Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. *New Phytologist*, 198(4), 983-1000.
64. Scoffoni, C., Rawls, M., McKown, A., Cochard, H., y Sack, L. (2011). Decline of leaf hydraulic conductance with dehydration: relationship to leaf size and venation architecture. *Plant Physiology*, 156(2), 832-843.
65. Scoffoni, C. L. Sack. (2013). Quantifying leaf vein traits. En *PrometheusWiki*. Revisado el 10 de noviembre del 2014. http://www.publish.csiro.au/prometheuswiki/tiki-pagehistory.pphp?page=Quantifying_leaf_vein_traits&peview=15
66. Seyfullah, L. J. (2012). Fossil Focus: Using plant fossils to understand past climates and environments. *Palaeontology Online*, 2(7): 1-8.
67. Statgraphycs Centurion XVI (ersición 16.1.11) [Software]. (1982-2010). StatPoint technologies, Inc.
68. Stranks, L., y England, P. (1997). The use of a resemblance function in the measurement of climatic parameters from the physiognomy of woody dicotyledons. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 131(1), 15-28.
69. Uhl, D., y Mosbrugger, V. (1999). Leaf venation density as a climate and environmental proxy: a critical review and new data. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 149(1), 15-26.
70. Uhl, D., Mosbrugger, V., Bruch, A., y Utescher, T. (2003). Reconstructing palaeotemperatures using leaf floras—case studies for a comparison of leaf margin analysis and the coexistence approach. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 126(1), 49-64.

71. Wilf, P. (1997). When are leaves good thermometers? A new case for leaf margin analysis. *Paleobiology*, 23(3), 373-390.
72. Wilf, P. (2008). Fossil angiosperm leaves: Paleobotany's difficult children prove themselves. *Paleontol. Soc. Paper*, 14, 319-333.
73. Wilf, P., Wing, S. L., Greenwood, D. R., y Greenwood, C. L. (1998). Using fossil leaves as paleoprecipitation indicators: an Eocene example. *Geology*, 26(3), 203-206.
74. Wing, S. L. y Greenwood, D. R. (1993). Fossils and fossil climate: the case for equable continental interiors in the Eocene. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 341(1297), 243-252.
75. Wolfe, J.A. (1993). A method of obtaining climatic parameters from leaf assemblages. *U S Geol Surv Bull.* 1993(2040):1-71.
76. Zar, J. (1996). *Bioestatistical Analysis*. New Jersey, Estados Unidos, Prentice Hall.
77. Zhu, Y., Kang, H., Xie, Q., Wang, Z., Yin, S., y Liu, C. (2012). Pattern of leaf vein density and climate relationship of *Quercus variabilis* populations remains unchanged with environmental changes. *Trees*, 26(2), 597-607.
78. <http://www.inegi.org/inegi/spc/doc/INTERNET/1-GEOGRAFIADDEMEXICO/MANUAL> (Revisado: 24/08/2015)
79. <http://www.leafgui.org>
80. <http://imagej.nih.gov/ij/>
81. <http://www.plant-image-analysis.org>
82. <http://www.tropicos.org>

Anexo 1: Aclarado de hojas.

Esta técnica se aplica a hojas actuales, principalmente a las obtenidas de ejemplares de herbario previamente identificados. Ayuda en la observación de caracteres que no son tan fácilmente observables como son los patrones de venación más altos, dado que el espesor del mesófilo y la cutícula impiden el paso de luz del microscopio y la visibilidad detallada de los patrones de venación (Martínez y Cevallos, 2005).

El procedimiento consiste en que en un vaso de precipitados se hierve agua sumergiendo en esta las hojas anteriormente colectadas, en caso de la colección del Instituto de Geología la mayoría de las hojas han sido colectadas en el Herbario Nacional de México MEXU. Las hojas se dejan en el agua caliente hasta que toman una consistencia flexible. Posteriormente, con el agua todavía tibia se prepara una solución de hidróxido de sodio al 10% o 20%, dependiendo de la delicadeza de la hoja y se dejan reposar sumergidas en esta disolución. Una vez que se enfría la solución, las hojas se colocan en cloro al 5% o 10% durante 24 horas, también dependiendo de la fragilidad del material. Pasadas las 24 horas se substituye el cloro por agua corriente y se dejan enjuagar por 24 horas más; a partir de aquí las hojas se tiñen con safranina “O”, dejándolas 24 horas en cada uno de los siguientes pasos: alcohol al 50%, safranina, alcohol al 50%, alcohol al 70% y alcohol al 100%.

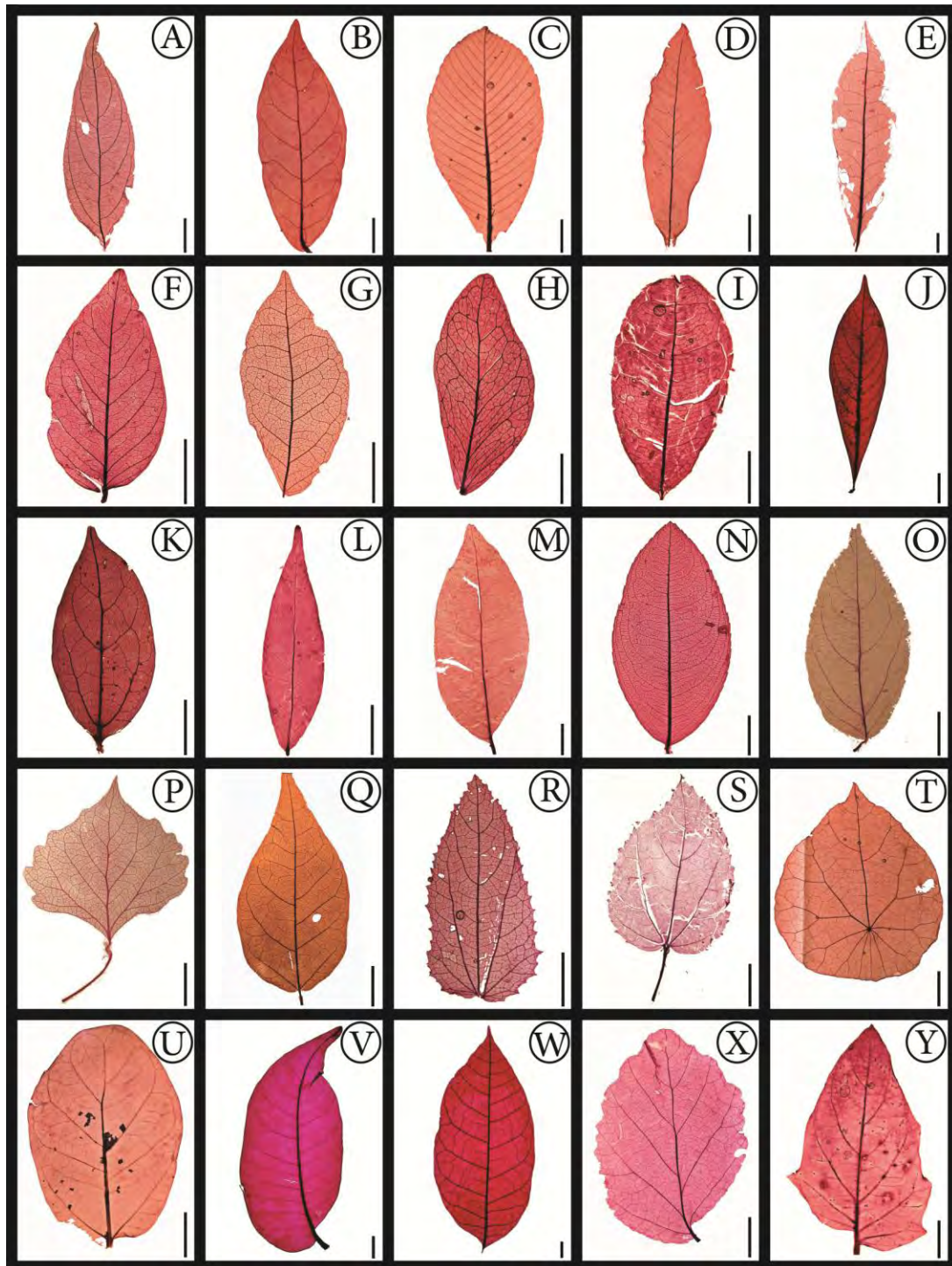
Una vez que el proceso de aclarado y tinción termine se procede a realizar el proceso de montaje del material. Este consiste en la inclusión de las hojas ya aclaradas y teñidas en resina poliéster para su conservación. Para esto, primero se deshidratan las hojas metiéndolas unos minutos en xilol, se eligen recipientes adecuados al tamaño de las hojas, en los que se vierte resina poliéster PP-cristal pura, calculando una capa delgada sobre la que se monta el material. Una vez que esta primera capa de resina gela lo suficiente sin estar totalmente seca, con una consistencia firme y pegajosa, se saca la hoja del xilol y se acomoda sobre la resina, cuidando no dejar burbujas y colocando el ejemplar totalmente extendido, poniendo a un lado una etiqueta de identificación con el nombre obtenido del ejemplar de herbario de la especie a la que pertenece la hoja y/o folio. Finalmente la hoja se cubre con más resina y se deja secar.

Cuando las piezas de resina se encuentran completamente secas se lijan, comenzando con una lija de agua de grano grueso (alrededor del número 180) para quitar todas las imperfecciones causadas por el molde y reducir el tamaño de la pieza, dejando la resina lo más delgada posible sin dañar la hoja, posteriormente se pule la pieza con lijas de tamaño 220, 320, 500, 1000 y 1500, quitando con cada una los rayones de la lija anterior. Finalmente la pieza se pule con una máquina pulidora marca ENMAR.

Anexo 2. Tabla de las especies de hojas seleccionadas de la colección de hojas aclaradas del instituto de Geología UNAM.

Orden	Familia	Especie	Hábito
Austrobaileyales	Schisandraceae	<i>Kadsura coccinea</i> (Lem.) A.C. Sm.	Trepadora
Caryophyllales	Polygonaceae	<i>Cocoloba hondurensis</i> Lundell	Árbol
Dilleniales	Dilleniaceae	<i>Tetracera sessiliflora</i> Triana & Planch.	Lianas o arbustos
Ericales	Primulaceae	<i>Rapanea myricoides</i> (Schltdl.) Lundell	Arbusto
	Theaceae	<i>Tutcheria shinkoensis</i> (Hayata) Nakai	Árbol
Fabales	Polygalaceae	<i>Securidaca diversifolia</i> L. S.F. Blake	Árbol
	Fabaceae	<i>Zygia konzattii</i> (Standl.) Britton & Rose	Árbol
		<i>Pithecellobium pachypus</i> Pittier	Árbol
Gentianales	Rubiaceae	<i>Canthium inerme</i> Kuntze	Árbol
Laurales	Lauraceae	<i>Machilus breviflora</i> (Benth.) Hemsl.	Árbol
		<i>Cinnamomum breedlovei</i> Lundell	Árbol
Magnoliales	Annonaceae	<i>Oxandra lanceolata</i> (Sw.) Baill.	Árbol
	Putranjivaceae	<i>Drypetes lateriflora</i> (Sw.) Krug & Urb.	Árbol
	Ochnaceae	<i>Ouratea mexicana</i> (Bonpl) Engl.	Árbol
	Salicaceae	<i>Flacourtia jangomas</i> (Lour.) Raeusch.	Arbusto
		<i>Populus deltoides</i> W. Bartram ex Marshall	Árbol
Malvales	Malvaceae	<i>Carpodiptera ameliae</i> Lundell	Árbol
Ranunculales	Menispermaceae	<i>Peltaea edouardii</i> (Hochr. Ex Chodat & Hassl.) Krapov & Cristóbal	Hierba
		<i>Physodium adenodes</i> (Goldberg) Fryxell	Árbol
Rosales	Moraceae	<i>Stephania abyssinica</i> (Quart.-Dill. & A. Rich.) Walp.	Liana
Sapindales	Anacardiaceae	<i>Ficus cotinifolia</i> Kunth	Árbol
	Burseraceae	<i>Astronium lecointei</i> Ducke	Árbol
Saxifragales	Hamamelidaceae	<i>Protium copal</i> (Schltdl. & Cham.) Engl.	Árbol
Solanales	Solanaceae	<i>Hamamelis virginiana</i> L.	Arbusto
		<i>Datura innoxia</i> Mill.	Arbusto

Anexo 3: Hojas aclaradas seleccionadas de la colección del Instituto de Geología, UNAM.



A. *Kadsura coccinea*; B. *Cocoloba hondurensis*; C. *Tetracera sessiliflora*; D. *Rapanea myricoides*; E. *Tutcheria shinkoensis*; F. *Securidaca diversifolia*; G. *Zygia konzattii*; H. *Pithecellobium pachypus*; I. *Canthium inerme*; J. *Machilus breviflora*; K. *Cinnamomum breedlovei*; L. *Oxandra lanceolata*; M. *Drypetes lateriflora*; N. *Ouratea mexicana*; O. *Flacourtia jangomas*; P. *Populus deltoides*; Q. *Carpodiptera ameliae*; R. *Peltaea edouardii*; S. *Physodium adenodes*; T. *Stephania abyssinica*; U. *Ficus cotinifolia*; V. *Astronium lecointei*; W. *Protium copal*; X. *Hamamelis virginia*; Y. *Datura innoxia*. (Escala = 1cm)

Anexo 4: Mediciones con Leaf gui.

Para poder obtener las mediciones con Leaf gui (Figura 1), es necesario que la imagen se encuentre en formato JPG o JPEG. Una vez que la imagen está en el formato adecuado, se abre el programa y se da clic en abrir imagen, se selecciona la imagen que se desea medir, buscándola en su ubicación de la computadora (Figura 2).

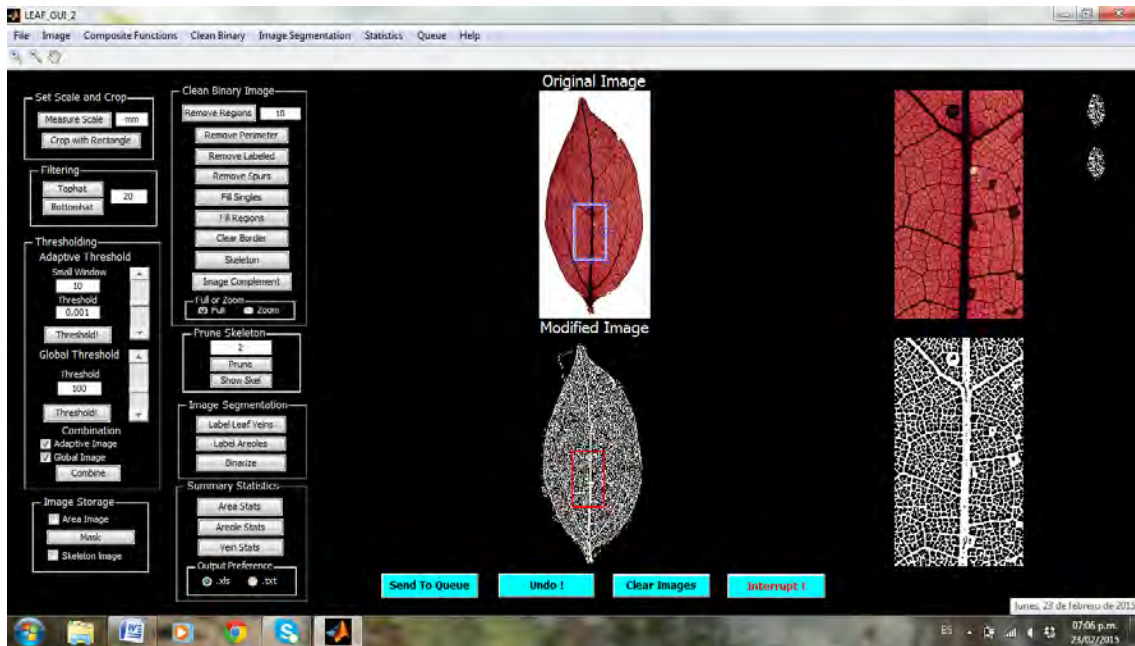


Figura 1: Interfaz de Leaf Gui

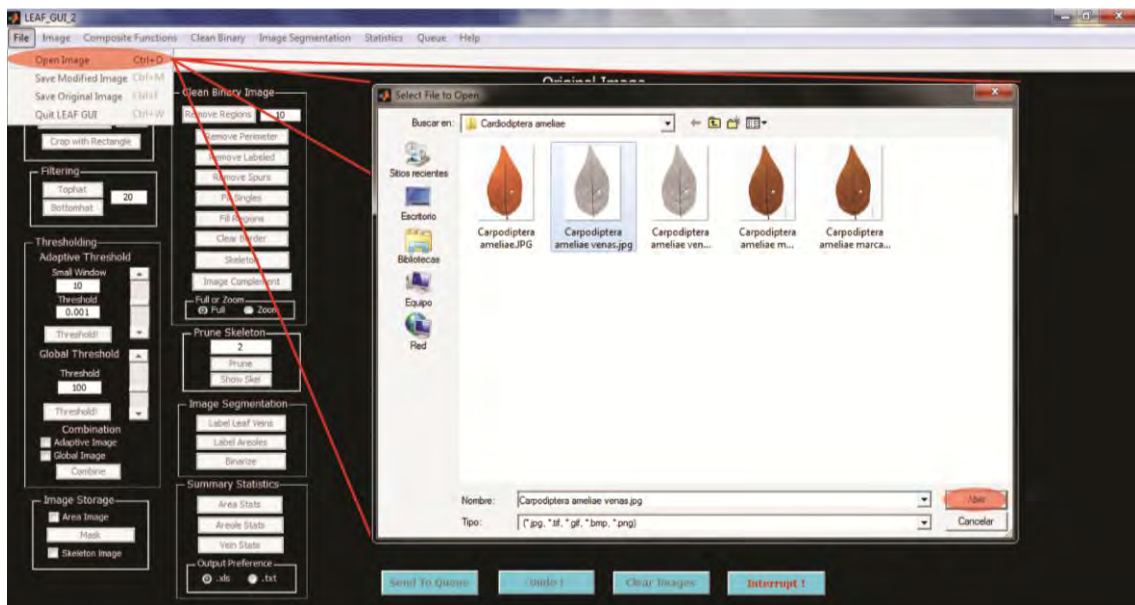


Figura 2: Búsqueda de la imagen en Leaf gui.

Una vez abierta la imagen deseada, se ajusta la escala de la hoja en el apartado "set scale and crop"; para esto es necesario que la imagen tenga una escala o alguna referencia que nos dé una medida de longitud conocida. En la ventana "measure scale" (Figura 3) se coloca la medida en milímetros del objeto que tenemos como escala y se presiona el botón de "measure scale", esto habilitará al cursor para que tracemos una línea recta sobre el objeto que tenemos como escala, haciendo que la línea trazada y la longitud coincidan; finalmente se da doble clic con el cursor sobre la línea y el valor que introdujimos en milímetros se convertirá en otro valor que corresponde a los pixeles por centímetro.

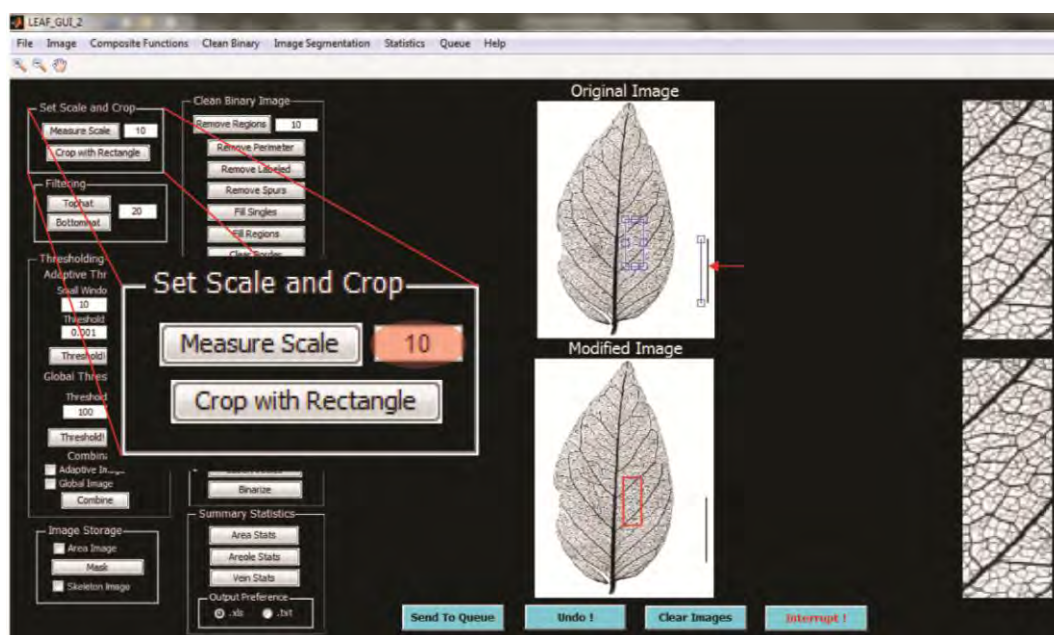


Figura 3: Ajustar escala en Leaf Gui.

Habiendo ajustado la escala, se debe revisar que en la imagen no aparezca ningún objeto que no pertenezca a la hoja y su venación, en caso de tenerlo se debe eliminar cortando la imagen con la herramienta "crop with rectangle" o usando una serie de herramientas más para lograr limpiar totalmente la imagen (revisar manual en www.leafgui.org).

Para este momento ya está lista la imagen para medir, entonces se procede a hacer el threshold (Figura 4), dando los valores que se observe que dan las mejores resoluciones de las venas, una vez realizado el thresholding a un nivel en el que se observen las venas de una forma aceptable, se aplica la herramienta para la eliminación de ruido (Figura 5) y por último se pide al programa que realice la medición de las venas, dando clic en el icono "vein stats". Una vez que el programa termina de realizar los algoritmos por parte de la computadora, se abrirá automáticamente una hoja de Excel con varias mediciones que el programa arroja por default (Figura 6), finalmente se selecciona la medición del

largo total de venas (Total Network Length) que está dado en mm y este valor se divide entre el área de hoja medida, obteniendo así el valor de la LVD.

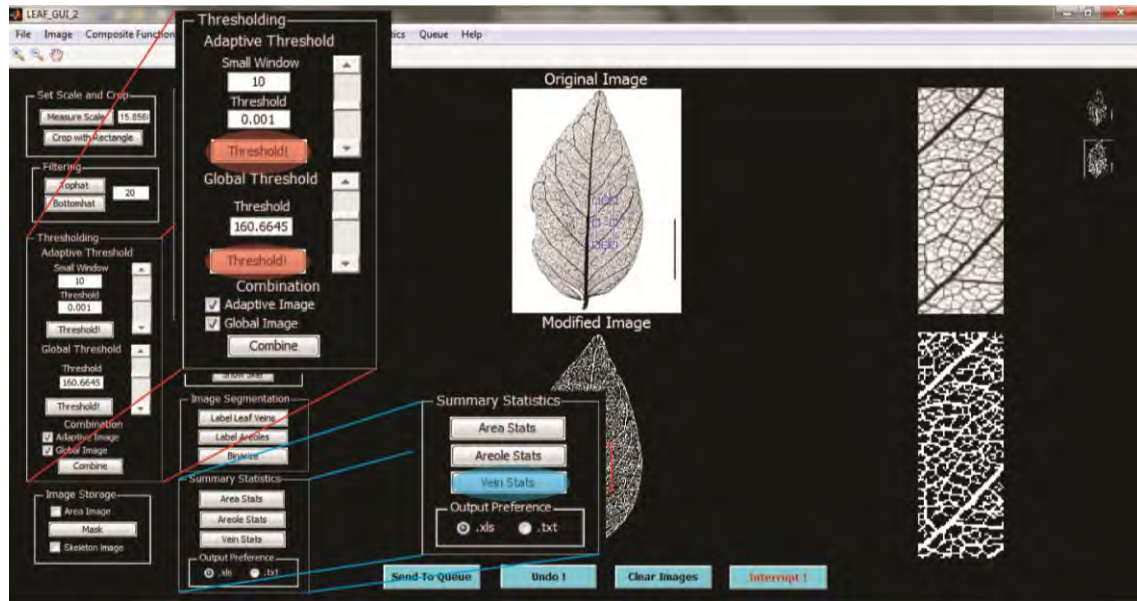


Figura 4: "Tresholding" y "Vein stats".

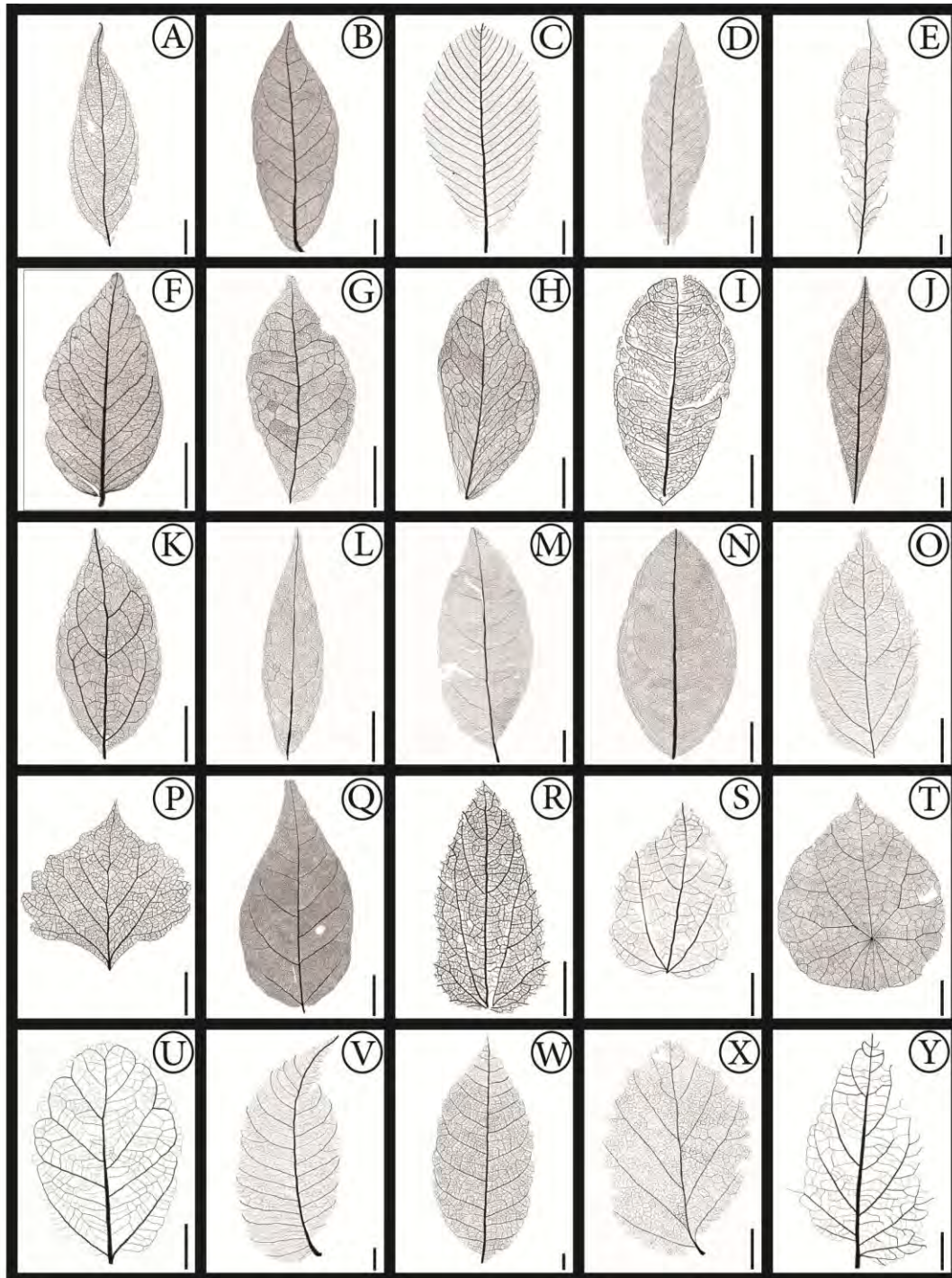


Figura 5: Método de eliminación de ruido con Leaf Gui.

Number of Edges	Number of Nodes	Total Network Length (mm)	Total Network Area (mm ²)	Mean Edge Length (mm)	Mean Width (mm)	Mean 2D Area (mm ²)	Mean 3D Surface Area (mm ²)	Mean Volume (mm ³)
5849	3856	2305.541992	219.8027548	0.164799594	0.068160791	0.011721551	0.036824338	0.001550592

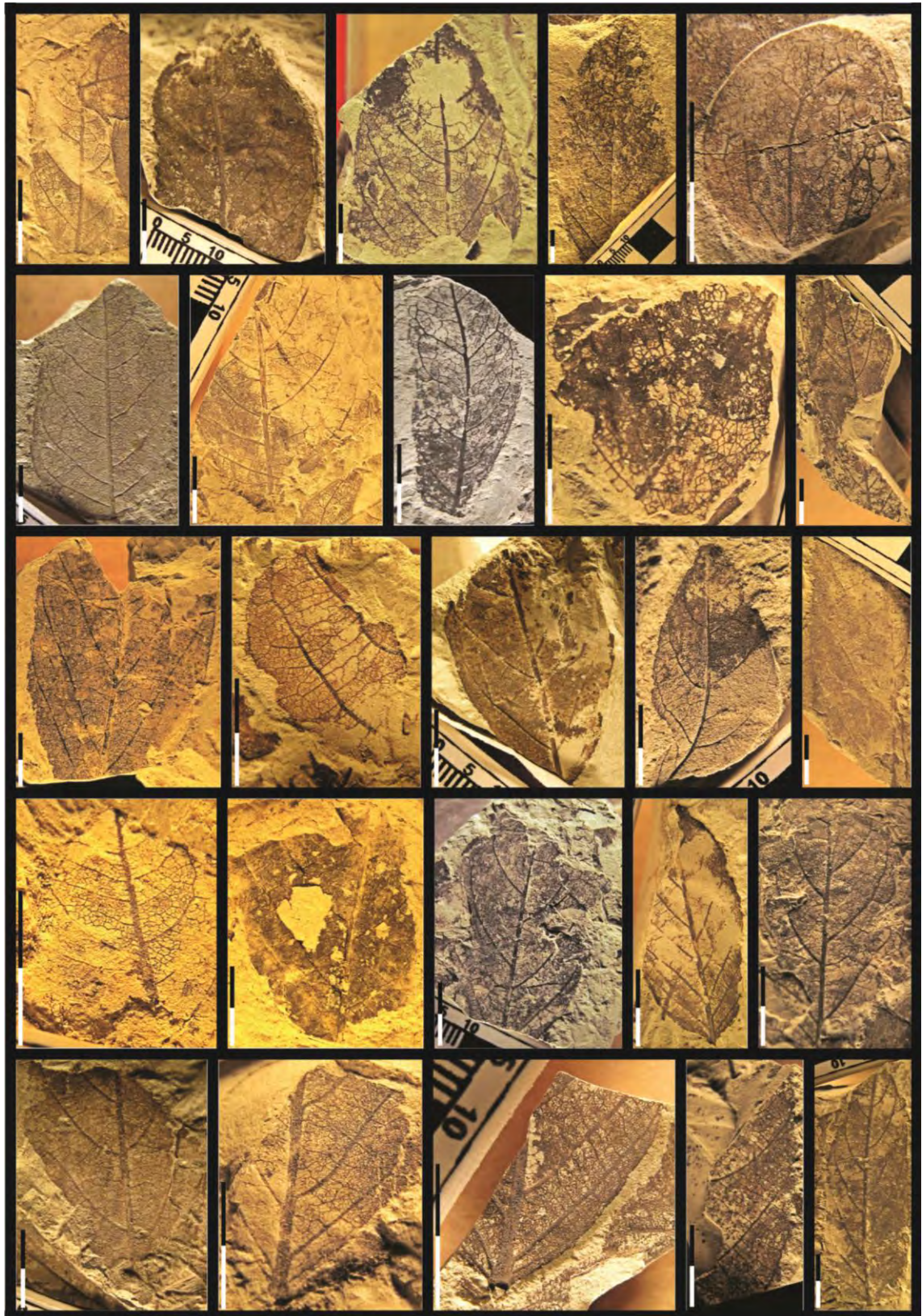
Figura 6: Hoja de Excel arrojada por Leaf Gui después de obtener las mediciones.

Anexo 5: Hojas aclaradas seleccionadas de la colección del Instituto de Geología, UNAM, imágenes que solo muestran las venas.



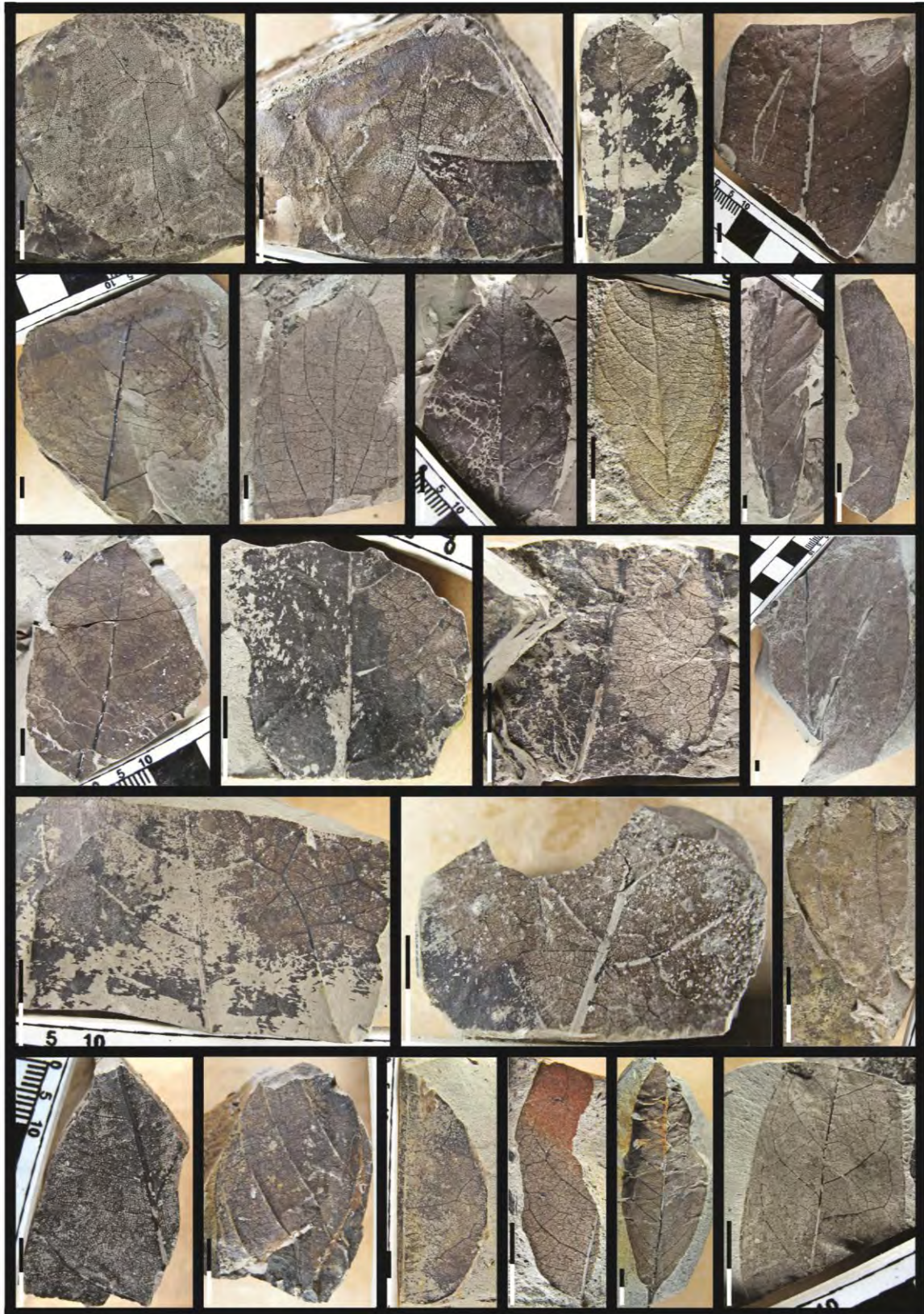
A. *Kadsura coccinea*; B. *Cocoloba hondurensis*; C. *Tetracera sessiliflora*; D. *Rapanea myricoides*; E. *Tutcheria shinkoensis*; F. *Securidaca diversifolia*; G. *Zygia konzattii*; H. *Pithecellobium pachypus*; I. *Canthium inerme*; J. *Machilus breviflora*; K. *Cinnamomum breedlovei*; L. *Oxandra lanceolata*; M. *Drypetes lateriflora*; N. *Ouratea mexicana*; O. *Flacourtia jangomas*; P. *Populus deltoides*; Q. *Carpodiptera ameliae*; R. *Peltaea edouardii*; S. *Physodium adenodes*; T. *Stephania abyssinica*; U. *Ficus cotinifolia*; V. *Astronium lecointei*; W. *Protium copal*; X. *Hamamelis virginiana*; Y. *Datura innoxia*. (Escala = 1cm)

Anexo 6: Muestras fósiles seleccionadas de la localidad de San Esteban Tizatlán, Tlaxcala.





Anexo 7: Muestras fósiles seleccionadas de la localidad de Ixtapa, Chiapas.



Anexo 8: Imágenes de venas marcadas de las hojas fósiles seleccionadas de San Esteban Tizatlán, Tlaxcala; segmento de 0.8 cm².



Anexo 9: Imágenes de venas marcadas de las hojas fósiles seleccionadas de Ixtapa, Chiapas, segmentos de 0.8 cm².

