



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**IMPLEMENTACIÓN Y MODIFICACIÓN DE DIVERSAS  
TÉCNICAS APLICADAS A LA EXTRACCIÓN DE  
CUTÍCULAS FÓSILES.**

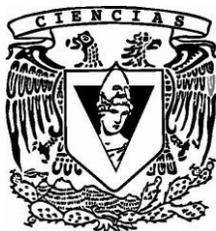
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**ANDREA PORRAS CARRASCO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. LAURA CALVILLO CANADELL  
2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

1. Datos de alumno:

Porras  
Carrasco  
Andrea  
56675215  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
Facultad de Ciencias  
Biología  
101001144

2. Datos del tutor.

Dra.  
Laura  
Calvillo  
Canadell

3. Datos del Sinodal 1.

Dra.  
Sonia  
Vázquez  
Santana

4. Datos del Sinodal 2.

Dra.  
Estela  
Sandoval  
Zapotitla

5. Datos del Sinodal 3.

Dra.  
Aurora  
Zlotnik  
Espinosa

6. Datos del Sinodal 4.

Dra.  
Teresa Margarita  
Terrazas  
Salgado

7. Datos del trabajo escrito.

Implementación y modificación de diversas técnicas aplicadas a la extracción de cutículas fósiles.

60 p  
2012

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología y al Instituto de Geología, UNAM por sus apoyos y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis que es parte de los proyectos de la Dra. Laura Calvillo Canadell CONACYT 104515 Arquitectura foliar y su aportación paleoclimática para la comprensión de la vegetación del mioceno al presente de Panotla, Tlaxcala” y por parte del Dr. Sergio R.S. Cevallos Ferriz CONACYT 82433 Y PAPIIT 219810 “Reemplazo ecológico del Cretácico al Cenozoico, el preámbulo de la biodiversidad actual.”

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Paleobotánica del Instituto de Geología, UNAM. La dirección estuvo a cargo de la Dra. Laura Calvillo Canadell.

## AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Laura Calvillo Canadell, por ser guía, confidente, por creer en mí y otorgarme la confianza y responsabilidad de nuevos retos, por hacerme parte de su familia, por el cariño y la comprensión, por ser no solo ejemplo académico, si no una excelente amiga, por permitirme ser parte de su vida y entrar en la mía. Por cada momento en el que necesite una platicadita, por estar incondicionalmente, por enseñarme que más allá de cualquier cosa los lazos unen y el cariño perdura.

Al Dr. Sergio Cevallos Ferriz, por su ejemplo, amistad y confianza. Gracias por darme la oportunidad de ser parte de un grupo inigualable, por enseñarme de la vida y de los no tan vivos (fósiles). Por su paciencia y por cada palmadita en la espalda incitándome a continuar hasta lograrlo, por cada nueva idea que compartió, por su amable sonrisa, por tanto y todo, muchas gracias ¡DOC!

A Enoch Ortiz Montejo, por ser cómplice y alentador de nuevos retos, por su ayuda en cada momento, por su paciencia, su confianza, por ser un amigo entrañable en las buenas y en las malas. Gracias por compartir tu tiempo, espacio, conocimiento y por los viajes que me enseñaron grandes cosas de la vida.

A las Doctoras, Sonia Vázquez, Estela Sandoval, Aurora Zlotnik y Teresa Terrazas, por su valioso tiempo, por cada una de sus sugerencias, por compartir ideas y motivarme a seguir mejorando.

A las Doctoras, Elena Centeno, Hilda Flores, Helga Ochoterena, Margarita Caballero, Socorro Lozano y el Dr. Enrique García, gigantes del conocimiento que me sorprendieron y me llevaron por el camino del saber, por cada una de las clases, practicas, consejos, asesorías y buenos momentos que han compartido.

A la M. en C. Susana Sosa y la Dra. Uxue Amadoz, por las facilidades y tiempo dedicado en explicarme algunas técnicas, por el interés y entusiasmo en mi trabajo, muchas gracias.

A Javier Avendaño por su gran apoyo en las visitas a la localidad Ixtapa y cada uno de los alumnos y amigos de la UNICACH que nos acompañaron y ayudaron en el trabajo de campo y aun después, Josué Luna, Jesús Díaz, Bruno Than Marchese, y tantos mas.

Al mejor laboratorio de cualquier era geológica, el honorable laboratorio de Paleobotánica del Instituto de Geología, UNAM: Aldo, Alma, Ana, César, Denise, Gris, Isabel, Ixchel, Juliana, Luis I, Luis II, Mar y Nidia, por su tiempo, paciencia, por su ayuda y cada una de las aportaciones académicas y personales, por brindarme un regalo invaluable, su amistad. Gracias por los mejores viajes de campo, porque con ustedes la vida en el Chango es más sabrosa!!!!

Por último, y no menos importante, a la Universidad Nacional Autónoma de México, en la cual tuve el honor de formarme académicamente y personalmente, hogar que me adopto y es un orgullo pertenecer, donde he conocido y aprendido lo mejor de mi vida, porque en cada uno de sus rincones hay una historia para compartir. A la Facultad de Ciencias y el Instituto de Geología, porque abrieron sus puertas y fueron mi segunda casa, por ser parte de esta gran familia que siempre me acompañara. GRACIAS.

Índice general.

Número de identificación	Contenido	Página
I	RESUMEN	6
II	INTRODUCCIÓN	7
II.I	Características de la cutícula vegetal	8
III	ANTECEDENTES	10
III.I	Algunas técnicas utilizadas para la extracción de cutículas fósil	11
III.II	Caracteres conservados en la cutícula fósil	16
IV	JUSTIFICACIÓN	17
V	OBJETIVO	17
VI	HIPÓTESIS	18
VII	MATERIAL Y MÉTODO	18
VII.I	Área de estudio	18
VII.I.a	Localidad 1. Ixtapa	20
VII.I.b	Localidad 2. El chango	22
VII.II	Trabajo de campo	22
VII.III	Trabajo en el laboratorio	23
VIII	RESULTADOS	24
VIII.I	Proceso químico para la extracción de cutículas	27
VIII.I.a	Técnica de Schultze	27
VIII.I.b	Técnica de HNO <sub>3</sub>	30
VIII.I.c	Técnica de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	33
VIII.I.d	Técnica de extracción de cutículas actuales: NaOH /safranina "O"	35
VIII.II	Aparatos estomáticos de cutículas fósiles	39
VIII.III	Aparatos estomáticos de cutículas actuales	41
IX	DISCUSIÓN	43
X	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	48
XI	LITERATURA CONSULTADA	49
XII	APÉNDICES	54
XII.i	Tipos de estomas	54

**Índice general de tablas**

<b>Número de tabla</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Comparación de caracteres genotípicos y fenotípicos de la cutícula y la hoja	15
2	Especificaciones en cada una de las técnicas y sus modificaciones	24
3	Modificaciones y resultados de las técnicas aplicadas a cada localidad	25
4	Evaluación comparativa de las dos técnicas aplicadas en el material de la localidad Ixtapa.	43

**Índice general de figuras**

<b>Número de figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Esquema de la cutícula vegetal	8
2	Algunas variantes del contorno de las paredes celulares de la epidermis	12
3	Estructura del aparato estomático	13
4	Mapa del área de estudio Ixtapa, Estado de Chiapas	18
5	Contexto geológico de la Formación Ixtapa	19
6	Mapa del área de estudio El Chango, Estado de Chiapas	20
7	Sección estratigráfica de la Formación Sierra Madre	21
8	Diagrama de la metodología empleada en la extracción de cutículas fósiles	26
10	Diagrama de la metodología empleada en la extracción de cutículas actuales	36

Índice general de láminas

Número de lámina	Contenido	Página
1	Ixtapa, Hojas fósiles con carbón en matriz de lutita.	28
2	Ixtapa, Fósiles tratados con solución de Schultz, vistos con luz UV.	28
3	Ixtapa, Improntas fósiles extraídas con acetato de celulosa.	29
4	Ixtapa, Impresión de células epidérmicas en cutículas fósiles.	29
5	Ixtapa, Técnica HNO <sub>3</sub>	31
6	Ixtapa, Técnica HNO <sub>3</sub>	31
7	Ixtapa, Impresión de células epidérmicas y aparatos estomáticos en cutículas fósiles de angiospermas.	32
8	El Chango, Técnica de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fósiles de gimnospermas.	34
9	El Chango, Impresión de células epidérmicas y aparatos estomáticos en cutículas fósiles de gimnospermas	34
10	Cutículas actuales, Myrtaceae	37
11	Cutículas actuales, Moraceae	38
12	Cutículas actuales, Rutaceae	38
13	Ixtapa, aparato estomático de angiosperma fósil "tipo" anomocítico	39
14	Ixtapa, aparato estomático de angiosperma fósil "tipo" ciclocítico	40
15	El Chango, aparato estomático de gimnosperma fósil tipo ciclocítico	40
16	Cutículas actuales, aparato estomático de tipo paracítico de Myrtaceae.	41
17	Cutículas actuales, aparato estomático de tipo ciclocítico de Moraceae	42
18	Cutículas actuales, aparato estomático de tipo paracítico de Rutaceae	42

## I. RESUMEN

El alto potencial de conservación de la cutícula fósil aunado al excelente mantenimiento de impresión de las células epidérmicas en las hojas la convierte en un recurso importante para los paleobotánicos en estudios taxonómicos y paleoambientales. El presente trabajo realiza un ajuste a las técnicas de Kerp, Upchurch, Aucour y Sandoval aplicadas a la extracción de cutículas fósiles del Mioceno y Cretácico de Chiapas. Las modificaciones realizadas a las técnicas comprenden 3 pasos fundamentales: primero, la limpieza y eliminación del carbón, segundo, la separación de la cutícula fósil de la roca portadora y por último, la eliminación del resto de sedimentos de la cutícula libre. Tanto la solución de Schultze como el  $\text{NHO}_3$  son excelentes reactivos para la eliminación del carbón de la hoja fósil, manteniendo estable el tamaño y la forma de la hoja por lo que se pueden observar patrones de venación, vénulas, tricomas, glándulas, dientes del margen así como la impresión de patrones celulares de la epidermis en la cutícula. Una de las principales aportaciones de este trabajo fue la extracción de la cutícula fósil en la cual se pudieron identificar dos aparatos estomáticos de angiospermas determinados morfológicamente como el tipo anomocítico y ciclocítico, este último corresponde morfológicamente al aparato estomático de *Ficus* sp. (Moraceae). La determinación se logró mediante la comparación de los aparatos estomáticos de cutículas de plantas actuales y fósiles. En cuanto a las gimnospermas, el aparato estomático identificado corresponde morfológicamente al tipo ciclocítico, que en las gimnospermas es característico de la familia de las Cupressaceae. Dichas correlaciones fortalecen las asignaciones taxonómicas realizadas previamente por otros autores a hojas fósiles de las localidades estudiadas, confirmando la importancia del aparato estomático como una herramienta de carácter diagnóstico en identificaciones taxonómicas. Sin embargo, las técnicas de extracción de cutículas fósiles, a la que son susceptibles aquel material altamente carbonizado, están lejos de ser generalistas ya que cada localidad fósil es particular, el material fósil y los procesos de fosilización le confieren características propias que se verán reflejadas en el tratamiento de extracción del material fósil.

## II. INTRODUCCIÓN.

El conocer los aspectos morfológicos sobre la biología de las plantas del pasado, permite generar hipótesis fundamentadas sobre el medio ambiente en el que vivían, el cómo evolucionaron o se conformaron, y así generar ideas cimentadas en evidencia directa del origen y las relaciones con las comunidades vegetales actuales (Weber, 2006).

Aunque la morfología comparativa de plantas vivas es una herramienta indispensable en los intentos de determinar las relaciones ancestrales y posibles caminos evolutivos, el registro fósil es insustituible prueba de dichos cambios a través del tiempo. Este registro es, en el mejor de los casos, muy fragmentado; sin embargo, hemos aprendido mucho sobre la historia de las plantas a través del estudio y manipulación de las técnicas adecuadas para el estudio de los fósiles (Bold et al, 1987).

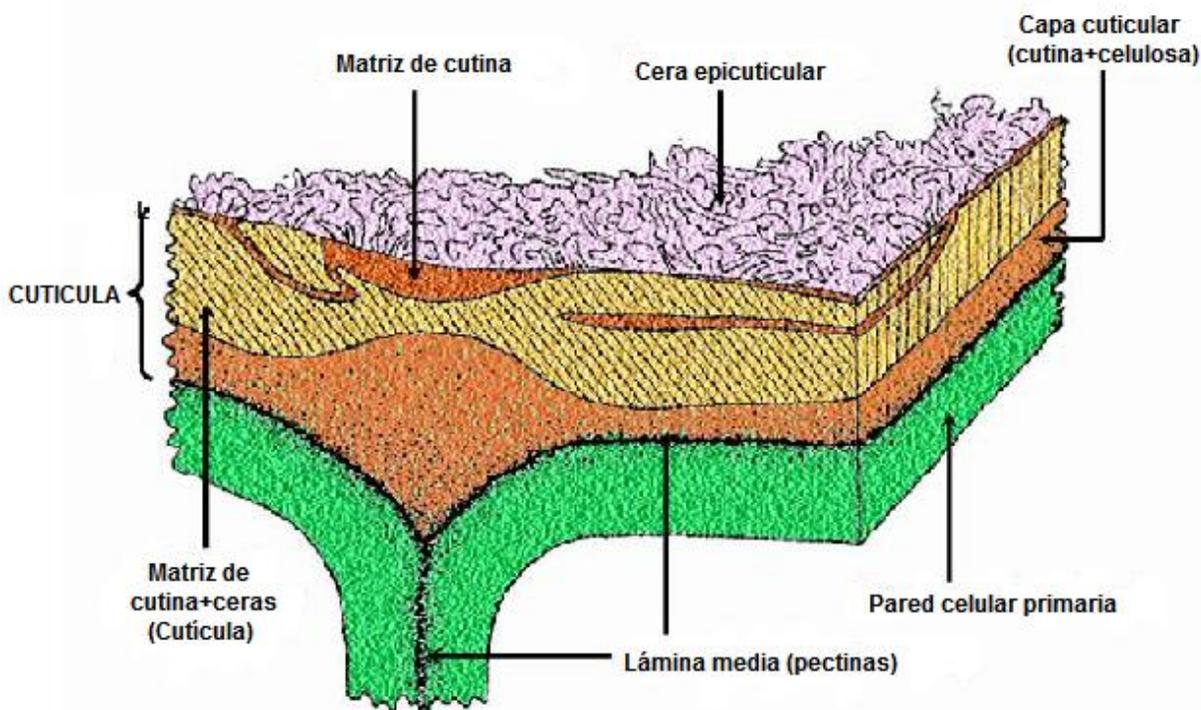
La acumulación constante de sedimentos a través del tiempo produce presión suficiente para comprimir a los órganos de la planta hasta ser solamente una delgada película de carbón. Este tipo de fósil se conoce como compresión y es útil para mostrar las características externas. Sin embargo, a veces, la cutícula puede resistir la descomposición y sobrevivir al proceso de fosilización quedando intacta. Esta cutícula reproduce fielmente las características de la superficie de los órganos de la planta, como es el caso de las hojas (Bold et al, 1987).

La presencia de cutículas de plantas en el registro fósil ha planteado interrogantes acerca de los factores responsables de su conservación. La composición química y litología circundante parecen ser determinantes durante el proceso de fosilización (Moésle et al, 1998). Aun cuando las paredes celulares de las plantas están compuestas por celulosa, la cual se degrada rápidamente, la cutícula es extremadamente resistente a las condiciones de óxido-reducción de los ambientes de sedimentación, lo que facilita su preservación en el registro fósil (Barclay et al, 2007), la cutícula es entonces el segundo componente más abundante del acervo fósil de angiospermas; sin embargo, el estudio de las cutículas fósiles es aún escaso (Upchurch, 1984).

El alto potencial de conservación de la cutícula en combinación con el hecho de que mantiene una excelente impresión de las células epidérmicas de las hojas la convierten en un recurso importante para los paleobotánicos en estudios taxonómicos y paleoambientales.

## II.1 Características de la cutícula vegetal.

La cutícula o membrana cuticular, consiste predominantemente de dos componentes lípidicos; la cutina, que constituye la matriz de la cutícula, y ceras solubles, así como celulosa y pectina (Esau, 1987), formando una capa transparente que se encuentra en la interfase entre la planta y su ambiente aéreo (Jeffree, 2006). La cutícula cubre las partes aéreas de la planta, excepto las raíces, poros estomáticos y polen. Esta delgada capa protectora es secretada al exterior de las células de la epidermis y es la capa más externa de los órganos de las plantas, cuya función principal es brindar protección a los tejidos internos e inhibir la pérdida de agua (Simpson, 2010). El espesor de la cutícula varía entre 0,5 y 15 micrómetros dependiendo de las especies vegetales, la zona donde crece la planta y su edad o estado de desarrollo (Lallana et al, 2006).



**Figura 1.** Esquema de la cutícula vegetal donde se muestran los diferentes estratos que la conforman (Tomado y modificado de Bukovak, et al. 1981).

Algunos autores distinguen en la cutícula varias capas (Figura 1). 1) *Capa Cuticular*: Se encuentra después de la lámina media, formada por varias capas de cutina y microfibrillas de celulosa 2) *Matriz de cutina y ceras*: Capa formada de cutina y ceras 3) *Cera epicuticular*: Depósitos de ceras, que suelen aparecer por fuera de la cutícula y tienen diversas formas, y 4) *Depósitos de sales minerales*: Son cristales de sílice que se distribuyen entre la celulosa y la cutina (Bukovak, et al. 1981).

El principal componente de la cutícula es la cutina, un polímero de ácidos grasos que funcionan como un sellador, impidiendo la pérdida de agua. La cutina está impregnada en las paredes exteriores de las células epidérmicas, creando una pared “cutinizada” (Steward y Rothwell, 1993). La cutina no es el único biopolímero que se encuentra en las cutículas de las plantas, la matriz cuticular también contiene cutano. La estructura molecular y la biosíntesis del cutano no se han estudiado a profundidad, pero se sabe que es mucho más estable a la degradación bioquímica que la cutina. De hecho, las cutículas fósiles encontradas en angiospermas y gimnospermas fósiles están constituidas por cutanos. Esto sugiere que las cutículas de las plantas dominadas por cutina, en lugar de cutanos, tienen un potencial menor de fosilización, y que el registro fósil de cutículas conservadas corresponde a taxones que originalmente tenía una cantidad significativa de cutanos en la matriz cuticular (Graham, 1993).

La función primaria de la cutícula vegetal es evitar la pérdida de agua hacia el exterior. Esta innovación en las primeras plantas vasculares fue fundamental durante el proceso de terrestreización en el Paleozoico. La ventaja adaptativa que confiere la cutícula es la prevención de la desecación fuera del medio acuático ancestral (Simpson, 2010). De tal forma, la cutícula de las plantas vasculares funciona como un impermeable, evitando la pérdida de agua y sustancias desde el interior celular, además es valiosa como una barrera física en la invasión microbiana y también puede reflejar la radiación ultra violeta (UV). Pruebas químicas y microscópicas sugieren que la cutícula está presente en la superficie epidérmica de briófitas, pastos marinos y macrófitas de agua dulce, pero es generalmente considerada como ausente en las algas. Esto último se basa en que se encuentran exentas de epidermis, además de que una capa cuticular sería perjudicial en el hábitat acuático, ya que las capas superficiales de cera retardan la absorción de agua, CO<sub>2</sub>, y minerales en las células de las algas (Thomas y Spicer, 1986).

### III. ANTECEDENTES

Fragmentos aislados de cutícula, esporas y tubos se encuentran en el registro fósil del Ordovícico Inferior a Medio, y se extiende hasta el Silúrico en el Devónico inferior. Aunque se sabe muy poco acerca de estos fragmentos fósiles, constituyen una importante fuente de datos paleobiológicos porque ocurren en un momento en el tiempo geológico que coincide con el origen de la biota terrestre. Los primeros registros de hojas fósiles con presencia de cutículas incluyen muestras del Ordovícico temprano de Túnez y principios del Ordovícico Medio de Arabia Saudita (Taylor y Taylor, 1993).

Algunos paleobotánicos como Baranova (1987), Dilcher (1974), Stockey (1993) y Barclay (2007), durante mucho tiempo y con gran esfuerzo se han dedicado al estudio de las cutículas fósiles mediante técnicas de extracción, concentrándose en la identificación taxonómica o en la evaluación y reconstrucción de las condiciones paleoambientales. Al mismo tiempo que Wolfe desarrollaba nuevas técnicas de identificación de restos foliares de angiospermas basadas en el estudio de la forma de las hojas y patrones de distribución de la venación. Dilcher (1974) argumentaba la importancia de utilizar en este tipo de análisis, además de los caracteres propuestos por Wolfe, los caracteres de la cutícula de la hoja.

Brongniart (1834), fue el primer paleobotánico en separar la cutícula de la epidermis de las hojas, al macerar en agua un gran número de hojas de angiospermas, a partir de las cuales rescató y separó la cutícula intacta. Brongniart describe a la cutícula como una "película" no celular de color gris transparente, incolora o amarillo pálido, que a veces muestra una red de líneas que indican la unión de las células epidérmicas con grandes aberturas correspondientes a la posición de los estomas.

Una de las primeras referencias a las cutículas fósiles fue hecha por Brodie (1842), quien comentó: "Cuando la arenisca es recién disuelta, la epidermis de los fósiles con frecuencia se despega". Brodie examinó algunas hojas de depósitos carbonosos y observó en la epidermis una capa transparente que evidenciaba la forma y disposición de los estomas y las células epidérmicas. El describió en primer lugar la apariencia externa de las hojas y luego procedió a comparar las cutículas fósiles con las cutículas de las especies vivas, y se encontró que la estructura confirmaba la identificación (Metcalf y Chalk, 1950).

Un trabajo sistemático en donde se utilizó a la cutícula como herramienta taxonómica fue el de Bornemann (1856) en cutículas fósiles de cícadas. Tiempo después se dio una sucesión de estudios de las cutículas de las plantas fósiles en los trabajos de licopodios por Florin (1951-54) y gimnospermas del Jurásico por Harris (1926).

El primer trabajo de morfología cuticular en plantas fósiles y plantas recientes fue el de Bandulska (1923-31) en coníferas y angiospermas del Eoceno. Antes de que Bandulska pudiera identificar las cutículas fósiles tuvo que hacer un estudio intensivo de determinadas familias de angiospermas actuales, por lo que fue capaz de asignar algunas de las cutículas fósiles a géneros claramente reconocibles en Lauraceae (Metcalfe y Chalk, 1950).

Archangelsky (1974) menciona que la cutícula tiene una composición particular, resistente a los agentes químicos, físicos y biológicos destructivos, por lo que tiene buenas posibilidades de fosilizar. En ella se reflejan claramente los contornos de la capa más externa de las células epidérmicas y principalmente los aparatos estomáticos; cuyos caracteres tienen importancia sistemática y son por lo tanto, utilizados en diagnosis específicas y aún genéricas. Por lo tanto, Kerp (1991) considera al análisis cuticular como un método valioso para la identificación, clasificación y correlación de restos de plantas fósiles.

### **III.I Algunas técnicas utilizadas para la extracción de cutículas fósiles.**

A través del tiempo la manera de interpretar y entender a la cutícula ha ido cambiando, el avance en la tecnología y el uso de las herramientas adecuadas ha permitido desarrollar e innovar técnicas que permiten aprovechar el fragmentado registro fósil, ofreciendo información muy valiosa de caracteres taxonómicos y ambientales a partir de los fragmentos aislados de las cutículas fósiles.

Las técnicas de estudio y preparación de las cutículas requieren de tratamientos precisos para aislarlas de los sedimentos que las contienen; dicha separación se efectúa mediante tratamientos físicos y químicos (Álvarez, 1982) y cuando se retira de la impronta y se monta para el examen microscópico, puede mostrar de manera espectacular la impresión de la epidermis de la planta fosilizada.

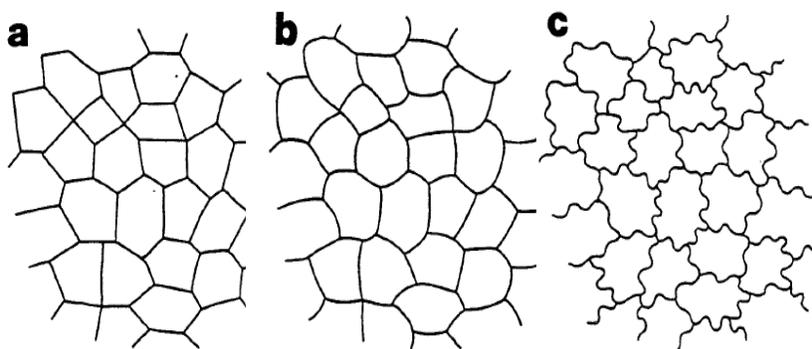
Las características morfológicas de la cutícula pueden ser estudiadas mediante el uso de películas transparentes, que pueden ser examinadas bajo un microscopio. La

película se puede hacer mediante el vertido de una sustancia líquida de plástico (esmalte transparente de uñas o acetatos de celulosa) sobre la hoja fósil, dejar que se seque, y luego desprender la película con la cutícula adherida a ella. Una técnica similar es la de insertar la superficie expuesta del fósil en plástico líquido (latex o caucho) en donde quedara impresa las características morfológicas de la cutícula. Otra técnica es la maceración de la roca portadora mediante el uso de los ácidos adecuados, de acuerdo a la composición de la roca. En algunos casos, la cutícula puede ser desprendida simplemente eliminando el exceso de roca de la superficie de la hoja fósil con la ayuda de una aguja de disección, sin la necesidad de transferencia de película o maceración (Taylor, et al. 2009)

Las técnicas de extracción de cutículas fósiles requieren una adecuación de acuerdo a los distintos fósiles; de tal modo que las técnicas o reactivos no serán utilizados siempre de la misma manera o con los mismos tiempos especificados en la bibliografía (Sandoval, 2005). El empleo de las técnicas y adaptación de las mismas dependerá del tipo de material con el cual se esté trabajando, el grado de preservación del fósil y el proceso de fosilización del mismo.

### III.II Caracteres conservados en la cutícula fósil.

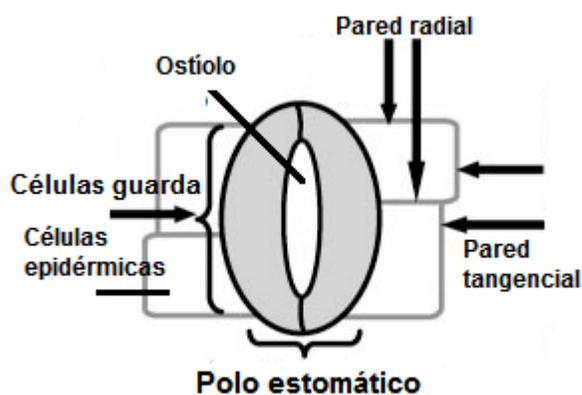
Las identificaciones taxonómicas, así como las reconstrucciones paleoambientales, se basan en caracteres morfológicos de la cutícula, como el tipo y ubicación de tricomas, las estructuras secretoras, las paredes de las células epidérmicas y principalmente la distribución y morfología de los aparatos estomáticos (Figura 2).



**Figura 2.** Algunas variantes del contorno de las paredes celulares de la epidermis que se puede percibir en las cutículas **a.** Paredes rectas **b.** Paredes curvas **c.** Paredes sinuosas (Tomado de Upchurch, 1995).

Una de las características más sobresalientes de la epidermis y que se conserva en las cutículas fósiles es el aparato estomático (Fig. 3) (Barclay, et al. 2007). La superficie

epidérmica de las hojas presenta un gran número de aperturas microscópicas llamadas estomas que se encuentran en todas las partes aéreas de la planta, pero son más abundantes en las hojas (Esau, 1977). La apertura y cierre se controla a través de los cambios en el tamaño y forma de dos células especializadas, llamadas células guarda, que flanquean la apertura estomática (Metcalf y Chalk, 1950) por donde la planta realiza la mayor parte del intercambio de  $O_2$ ,  $CO_2$ , vapor de agua y otros gases, a su vez, éstas se encuentran rodeadas por 2 o más células subsidiarias (Gates, 1980).



**Figura 3.** Estructura del aparato estomático que indica las posiciones de las paredes radial y tangencial, la zona lateral y polar, posición del ostiolo, las células guarda y células epidérmicas.

El examen de la epidermis en vista superficial muestra que existen grandes variaciones en el tamaño de los aparatos estomáticos, así como en su frecuencia y distribución, característica distintiva de los diferentes grupos de plantas (Thomasson, 1997), por lo que el tipo de hoja según la ubicación de los aparatos estomáticos ha sido a través del tiempo un carácter de valor taxonómico como lo señalan Metcalfe y Chalk (1950).

La morfología de los aparatos estomáticos nos permite clasificarlos según el número y disposición de células guarda en, *actinocítico*, *anisocítico*, *anomocítico*, *desmocítico*, *diacítico*, *ciclocítico*, *hemiparacítico*, *laterocítico*, *paracítico*, *pericítico*, *polocítico*, *saurocítico*, *estefanoicítico* y *tetracítico* (Anexo 1) de acuerdo a la clasificación de Baranova (1987), Dilcher (1974) y Metcalfe (1985). Con solo catorce tipos distintos de aparatos estomáticos reconocidos entre las angiospermas, el aparato estomático por sí sólo no puede ayudarnos a resolver taxonómicamente las más de 400 familias de angiospermas actuales. Otros caracteres epidérmicos como la presencia/ausencia de tricomas, el tipo de tricomas, la presencia de papilas y la morfología de las células de la

epidermis, en relación con el aparato estomático, son necesarios para determinar la afinidad taxonómica de la cutícula fósil (Barclay, et al. 2007).

La cantidad de aparatos estomáticos presentes en la superficie adaxial (haz) en comparación con el envés (superficie abaxial) es característica distintiva de diferentes especies. Las plantas con aparatos estomáticos en el haz son llamadas epiestomáticas, las que tienen en el envés son hipoestomáticas, mientras que aquellas con un número aproximadamente igual de aparatos estomáticos en haz y envés son ambiestomáticas (Gates, 1980). Así mismo, se debe destacar el valor asignado a este carácter como rasgo de adaptación a un determinado ambiente. La frecuencia o densidad de aparatos estomáticos, que es el número de estomas por unidad de área, representa un gran componente de variación ambiental, que permite discernir entre hojas de la misma planta y entre sectores de una misma hoja (Esau, 1977).

Sin embargo, las reconstrucciones paleoambientales requieren caracteres morfológicos con un alto grado de plasticidad ecofenotípica, dichos caracteres están necesariamente controlados por diferentes parámetros ambientales, como la temperatura, humedad, luz y composición atmosférica. Los estudios modernos han mejorado la comprensión de las relaciones entre la respuesta morfológica y anatómica de la hoja a los cambios en el entorno abiótico. Se ha aumentado la precisión de las reconstrucciones paleoambientales basados en cutículas fósiles por medio de las características morfológicas de valor taxonómico en relación al medio ambiente, como el tipo del aparato estomático, las estructuras secretoras, estrías epidérmicas, tipo y ubicación de tricomas (Tabla 1). Otras características morfológicas son el resultado de una interacción entre el genotipo y la expresión fenotípica, tales como la densidad de tricomas y la distribución de los aparatos estomáticos en las hojas (Barclay, et al. 2007). Los estudios modernos han mejorado nuestra comprensión de las relaciones entre la respuesta morfológica y anatómica de la hoja a los cambios en el entorno, dando mayor precisión a las reconstrucciones paleoambientales basados en cutículas fósiles

**Tabla 1.** Comparación de caracteres de la cutícula y la hoja controlados predominantemente por genes (genotípicamente) versus el ambiente (fenotípicos) (Barclay et al, 2007)

	<b>Carácter</b>	<b>Genotípico</b>	<b>Fenotípico</b>	
<b>CUTÍCULA</b>	Tipo y posición de las papilas	X	X	
	Estructuras secretoras	X		
	Tipo del aparato estomático	X		
	Distribución estomática	X		
	Posición estomática	X	X	
	Estrías	X	X	
	Tricomas	X		
	Base del tricoma	X		
	Pared celular			X
	Hidatodos			X
	Número y tamaño de las papilas			X
	Densidad estomática			X
	Densidad de tricomas			X
	<b>HOJA</b>	Parénquima en empalizada		X

Tratar de determinar qué caracteres son los más apropiados para la identificación taxonómica o por el contrario inferir las condiciones paleoambientales se han visto obstaculizadas por la falta de material y colecciones de referencia de cutículas. El generar bases de datos de técnicas, simplificadas y con flexibilidad para ser aplicadas a material fósil con diversas características, composición litológica e incluso tiempo geológico permitirá la creación de colecciones de cutículas como una herramienta importante en el estudio de la vegetación fósil y actual.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Los fósiles son documentos biológicos e históricos que aportan importante evidencia sobre la evolución de la vida en la Tierra. A pesar de esto, el registro fósil de algunas localidades está pobremente conservado y altamente deteriorado, lo que hace muy difícil su identificación taxonómica y más complicada las reconstrucciones ambientales. Por lo que, el alto potencial de conservación de la cutícula fósil en combinación con el hecho de que mantiene una excelente impresión de las células epidérmicas de las hojas la convierten en un recurso importante para los paleobotánicos en estudios taxonómicos y paleoambientales.

A pesar de esto, las técnicas referidas en múltiples estudios cuticulares resultan someras y poco específicas, de manera que la obtención de resultados satisfactorios en material fósil distinto en una o más características, de acuerdo a lo citado en cada técnica, resulta difícil o escaso. Sin embargo, las técnicas de extracción de cutículas fósiles, a las que son susceptibles aquel material altamente carbonizado y presente en distintas localidades, están lejos de ser generalistas ya que cada localidad fósil es particular, el material fósil y los procesos de fosilización le confieren características propias; de tal manera que el conocimiento de las técnicas de extracción de cutículas sumado a la naturaleza de nuestro fósil nos permite realizar variaciones a las técnicas de acuerdo al objetivo del estudio en cuestión, haciendo posible optimizar las técnicas en términos de tiempo, costo y beneficio, generando una gama de tratamientos físicos y químicos que varían desde el simple desprendimiento eliminando el exceso de roca, hasta violentos ataques químicos para aislarlas de los sedimentos contenedores.

Es entonces que este trabajo se concentra en rescatar las bases de algunos de los métodos de extracción de cutículas fósiles para ser implementadas en material fósil de diferentes localidades y tiempos geológicos, incluso de diferentes grupos de plantas, siendo el primer registro en México de extracción de cutículas fósiles de angiospermas, generando una importante fuente de información alternativa taxonómica.

## **V. OBJETIVOS**

- Extracción y tratamiento de cutículas conservadas en hojas fósiles.
- Implementación y modificación de diversas técnicas sobre cutículas de hojas fósiles del Mioceno y Cretácico de Chiapas.

## **VI. HIPÓTESIS**

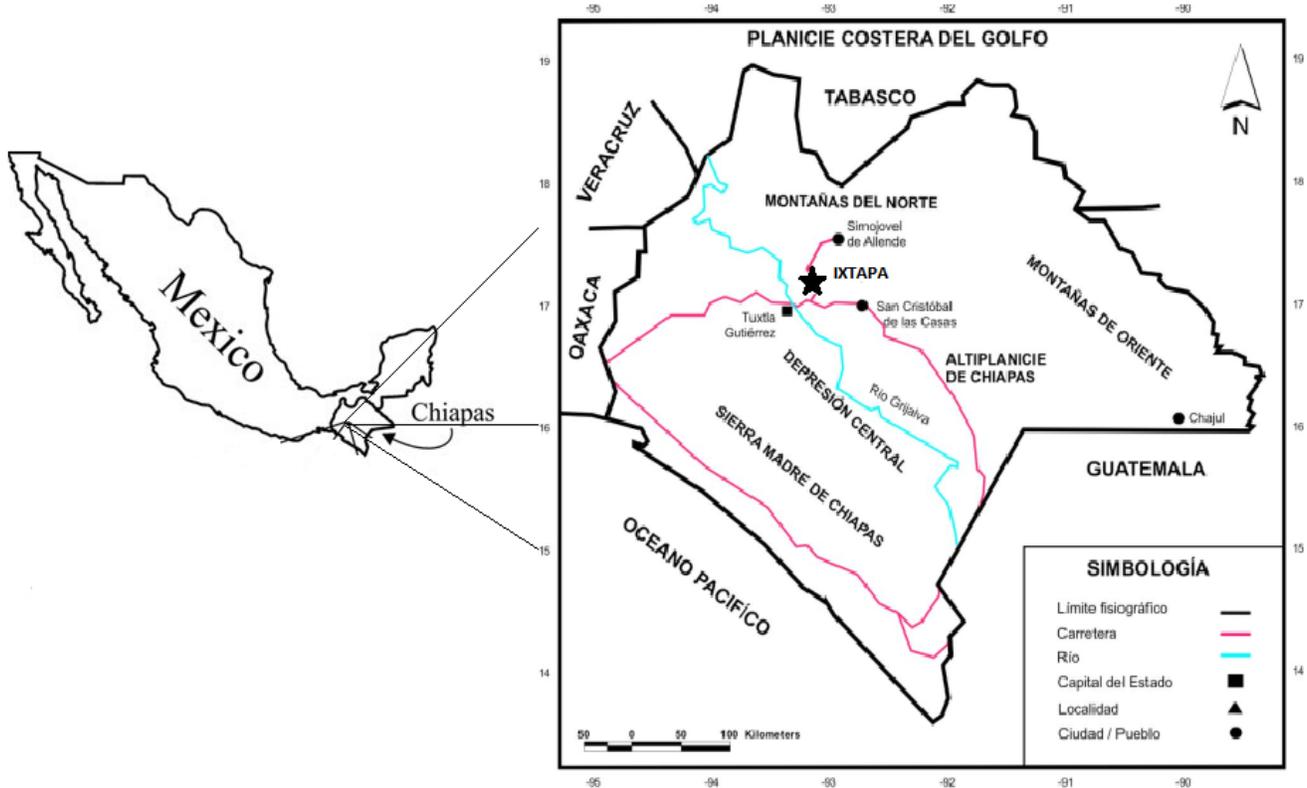
Si hojas fósiles conservan materia orgánica y dentro de ésta, la cutícula es de lo más resistente a la destrucción por los procesos de fosilización, la aplicación y modificación de las técnicas físicas y químicas a las impresiones carbonosas permitirá su extracción de cutículas, especialmente si se adecuan a las condiciones de los distintos fósiles de diferentes localidades y tiempos geológicos, brindando una importante fuente de información alternativa taxonómica y proxi ambiental.

## MATERIALES Y MÉTODO

### VII.I Área de estudio

#### VII.IA.Localidad 1.Ixtapa.

Se encuentra a 0.6 km al Norte del poblado Ixtapa sobre la carretera federal 195 Ixtapa-Soyaló a lo largo del cauce del Río Hondo, ubicado en la parte occidental de la región centro-septentrional del Estado de Chiapas, entre las coordenadas geográficas 16°48'42.2" Lat. N 92° 54'33.7" Long. W (Figura 4), con una elevación de 1080 msnm ([www.ixtapa.chiapas.gob.mx](http://www.ixtapa.chiapas.gob.mx)) y a unos 46 km al Noreste de Tuxtla Gutiérrez, la capital estatal (Ferrusquía, 1996).



**Figura 4.** Mapa del área de estudio Ixtapa, Chiapas, México (Tomado y modificado de Peralta-Medina, 2009).

De acuerdo con lo expresado en la Carta Climática de la República Mexicana (INEGI e Instituto de Geografía, 1970) se tiene un régimen climático que varía de cálido subhúmedo de gran a poca humedad, verano fresco lluvioso y mes más cálido anterior a junio (Ferrusquía, 1996). El tipo de clima es (A)C(fm) semicálidohúmedo con lluvias todo el año con un promedio de precipitación anual de 1100 mm. La temperatura

máxima es 33°C en verano y la mínima de 9°C en invierno (www.ixtapa.chiapas.gob.mx).

La vegetación en Chiapas ha sido extensamente estudiada, sin embargo los estudios monográficos sobre la vegetación de Ixtapa-Soyaló son escasos. De acuerdo con Miranda (1963) la mayor parte de la vegetación está cubierta por un bosque de pino-encino, con una pequeña franja occidental de selva baja decidua y un poco de selva alta siempre verde, en tanto que Rzedowski (1988) generaliza y señala una vegetación de tipo bosque tropical subperennifolia.

**Características Geológicas.** La localidad forma parte de la Formación Ixtapa (Ferrusquía, 1965 y 1996), constituida por unidades litoestratigráficas cenozoicas (Mioceno) fechadas con edad de 12.22 a 15.25 Ma. mediante datos paleontológicos y radiométricos de K-Ar, provenientes de una toba vítrea recolectada cerca del puente del Río Hondo. La secuencia sedimentaria tiene un espesor de 3000 a 3500 m, una extensión superficial de 31.19 km<sup>2</sup> y se encuentra formada predominantemente por una secuencia piroclástica-epivolcanoclástica (Ferrusquía, 1996) y en menor proporción por lutitas con intercalaciones de areniscas y conglomerados de calcita (Heuer, 1965), de lo cual se concluye que la Formación Ixtapa se depositó en un complejo de ambientes deposicionales, predominantemente continentales fluviolacustres, que constituyen localmente ambientes transicionales de baja energía. La Formación Ixtapa se encuentra sobreyaciendo al grupo Río Hondo, de edad Mioceno Medio y suprayaciendo a la Formación Punta de Llano del Plioceno Superior-Pleistoceno (Figura 5) (Ferrusquía, 1996).



**Figura 5.** Contexto Geológico de la Formación Ixtapa (Tomado de Peralta-Medina, 2009).

## VII.IB.Localidad 2. El Chango.

La cantera El Chango se encuentra a unos 30 km al suroeste de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, con coordenadas geográficas N  $16^{\circ}34'14''$  y W  $93^{\circ}16'11''$  (Figura 6) y con una elevación de 820 m (Vega, et al., 2007), localizada en las cercanías del municipio de Ocozocoautla de Espinosa, ubicado en la parte occidental del Estado, abarcando parte de la Depresión Central y de las Montañas del Norte ( <http://www.e-local.gob.mx>).

El clima varía de cálido subhúmedo a cálido-húmedo, y una vegetación que va desde selva media a selva alta caducifolia (<http://www.e-local.gob.mx>).

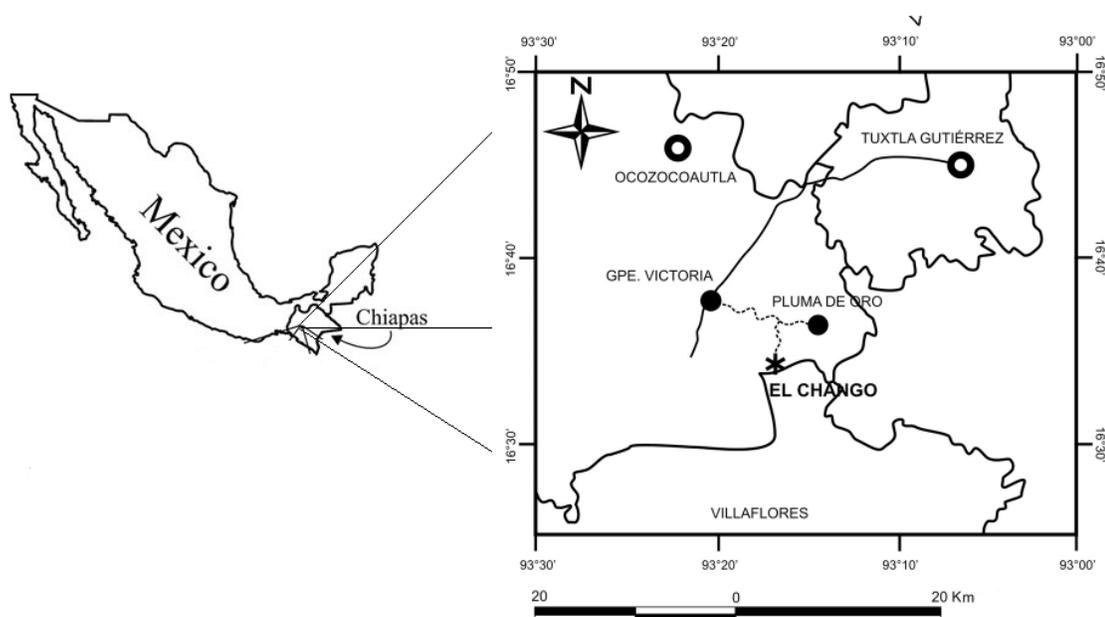
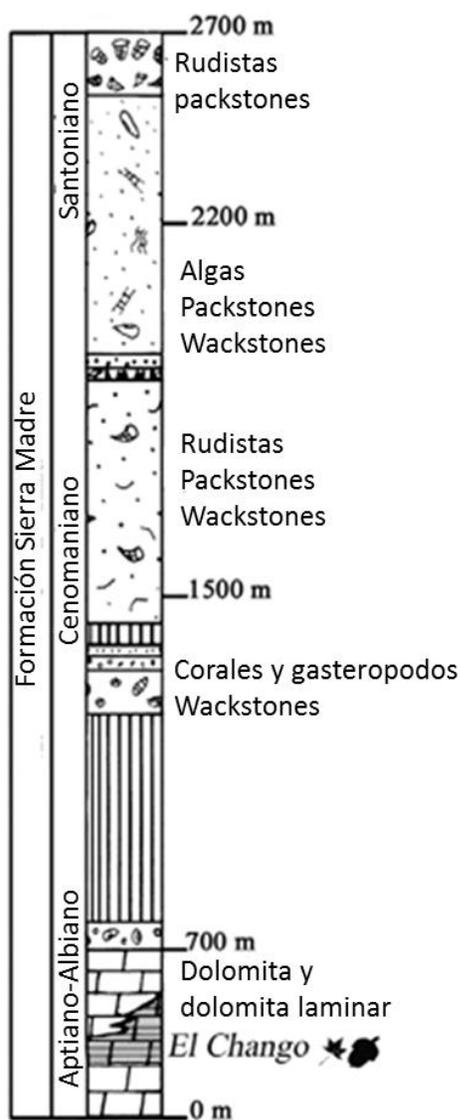


Figura 6. Mapa del área de estudio El Chango, Chiapas, México (Tomado de Vega, et al., 2007).

**Características geológicas.** Esta localidad pertenece a la Formación Sierra Madre, Aptiano-Campaniano en relación al registro fósil de peces e invertebrados. En la cantera afloran estratos finos de caliza laminar que representan ambientes de depósito marino y transicionales (González, et al., 2011) que corresponden a la base de la Formación Sierra Madre (Figura 7) definida como una secuencia de 2.590 m de dolomitas y calizas, que contienen flora y fauna de lagunas costeras/esteros y ambientes continentales evidenciado por el registro fósil, en su mayoría peces, moluscos, crustáceos, insectos, gimnospermas y angiospermas (Vega, et al., 2007).

La localidad El Chango fue asignada a la Formación Sierra Madre bajo el criterio de su relación geográfica con la región de Ocozocoautla; sin embargo, aún en este momento se desconocen los límites de los estratos que afloran. La ausencia de estudios bioestratigráficos detallados junto con la falta de fósiles índice no permiten una asignación puntual a los estratos de El Chango, por lo que su relación temporal dentro de la Formación Sierra Madre es a priori (Alvarado, et. al, 2009).



**Figura 7.** Sección estratigráfica de la Formación Sierra Madre, que muestra la posición relativa de los depósitos que afloran en la localidad El Chango, Chiapas, México (Tomado y modificado de Vega, et al., 2007).

## VII.II Trabajo de campo.

Se realizaron un total de seis colectas en el periodo del 2006 al 2011, en la localidad de Ixtapa y tres colectas más en El Chango, ambas en Chiapas, México. De lo recolectado se seleccionó el material susceptible a la técnica de extracción de cutículas fósiles de acuerdo con su estado de conservación y sus características morfológicas.

Los criterios a considerar para maximizar la probabilidad de que el material sea susceptible a las técnicas de extracción de cutículas fósiles son: 1) *el color de la impronta*, el alto contenido de materia orgánica produce una coloración negro o café oscuro. 2) *el grado de preservación*, cuando la preservación del fósil es buena los fragmentos de la hoja fósil son de textura lisa y brillante. 3) *la composición de la roca portadora*, para la aplicación de la técnica adecuada, y finalmente, 4) *la abundancia de fragmentos de plantas fósiles* (Upchurch, 1995).

## VII.III Trabajo en laboratorio.

**1) Limpieza y preparación del material fósil.** El material fósil fue depositado en el Laboratorio de Paleobotánica, Instituto de Geología, UNAM para limpieza y posterior estudio. El material se seleccionó de acuerdo con su estado de conservación y sus características morfológicas, este se limpió y redujo el tamaño de la roca matriz, mediante métodos mecánicos para una mejor manipulación.

**2) Pruebas de extracción de cutículas fósiles.** Se realizaron en fragmentos de hojas fósiles y hojas fósiles completas, con un número de muestras cercano a los 200 fragmentos, de un aproximado de 4 cm. Fueron 15 hojas completas de angiospermas correspondientes a la localidad Ixtapa y 23 muestras de hojas fósiles de gimnospermas de la localidad El Chango.

**3) Comparación con material actual y fósil.** Para la comparación morfológica con cutículas de plantas actuales, se obtuvieron hojas de ejemplares herborizados de la colección del Herbario Nacional de México (MEXU) UNAM (Familia Myrtaceae, *Eugenia biflora* y *Eugenia myrtifolia*) y muestras frescas que corresponden a familias previamente asignadas al material fósil de la localidad Ixtapa, (Familia Rutaceae y Moraceae) de las que se extrajo la cutícula.

**4) Técnicas de extracción de cutículas.** Para la extracción de las cutículas fósiles se llevaron a cabo tres pasos fundamentales, implementando y modificando técnicas histológicas, 1) eliminación y limpieza del carbón, 2) separación de la cutícula fósil de la roca portadora y 3) eliminación del resto de sedimentos de la cutícula libre. Posteriormente las cutículas se tiñeron y montaron en gelatina glicerizada.

**5) Observación y descripción de ejemplares.** Las observaciones morfológicas se realizaron bajo un microscopio estereoscópico *Zeiss® Stemi DV4* y fueron fotografiados con cámara digital *Canon® PowerShot SD1100IS*, las preparaciones fueron observadas bajo un microscopio óptico *Zeiss® Primo Stary* fotografiadas con una cámara digital *Canon® PowerShot A640*, y un microscopio petrográfico *Karl Zeiss®* con cámara digital *Canon® PowerShot A640*. Para la elaboración de láminas fotográficas se usó *Adobe® PhotoShop 7.0*.

**6) Microscopio con luz Ultra Violeta.** Se realizaron observaciones bajo un microscopio estereoscópico con luz UV, herramienta que nos permite ver textura y relieve de las hojas fósiles limpias de carbón, dando una mejor resolución y realce. Fueron fotografiadas con una cámara digital *Canon® PowerShot A640*.

**7) Identificación de tipos de aparatos estomáticos.** Se utilizó el programa *Adobe® PhotoShop 7.0* para la elaboración de láminas fotográficas, utilizando herramientas de contraste en los aparatos estomáticos, se compararon con los tipos estomáticos de plantas actuales de acuerdo a las clasificaciones de Metcalfe (1950), Dilcher (1974) y Baranova (1987).

## VII. RESULTADOS

El ajuste metodológico realizado a algunas técnicas que se consultaron bibliográficamente se resume en la siguiente tabla.

**Tabla 2.** Especificaciones de cada una de las técnicas y las modificaciones realizadas en este trabajo.

Técnica	Especificaciones	Modificaciones
Schultze (Kerp, 1991)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fósiles en roca matriz de caliza</li> <li>• Maceración de la roca con 0.5-1 N HCl, 1-48 h.</li> <li>• Los restos cuticulares de color oscuro se blanquean en una solución saturada de Schultze (KClO<sub>3</sub> en HNO<sub>3</sub>, 60%)</li> <li>• Limpieza con agua destilada.</li> <li>• Montaje en resina plástica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fósiles en roca matriz de limolita.</li> <li>• Los restos cuticulares de color oscuro se blanquean en solución Schultze 1:1 (KClO<sub>3</sub> en HNO<sub>3</sub>)</li> <li>• Limpieza con NaOH al 1%, 10 min.</li> <li>• Extracción de la cutícula con acetato de celulosa.</li> <li>• Tinción de la cutícula con safranina al 1%.</li> <li>• Montaje en gelatina glicerizada.</li> </ul>
HNO <sub>3</sub> (Upchurch, 1995)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fósiles en roca matriz de caliza.</li> <li>• Maceración de la roca con HCl al 10%, 1-48 h.</li> <li>• Los restos cuticulares de color oscuro se blanquean en una solución 1:1 de HNO<sub>3</sub></li> <li>• Limpieza con solución NaOH al 5%.</li> <li>• Tinción de la cutícula con safranina al 1%</li> <li>• Montaje en poliestireno plástico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fósiles en roca matriz de limolita.</li> <li>• Los restos cuticulares de color oscuro se blanquean en una solución 1:1 de HNO<sub>3</sub>, 1-48 h.</li> <li>• Limpieza con NaOH al 5%, 10 min.</li> <li>• Extracción de las cutículas con aguja de disección.</li> <li>• Tinción de la cutícula con safranina al 1%.</li> <li>• Montaje en gelatina glicerizada.</li> </ul>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Aucour y Anne-Marie, 2009)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fósiles con roca matriz arcilla.</li> <li>• Maceración de la roca con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 18-37%, 1-4 h.</li> <li>• Los restos cuticulares de color oscuro se blanquean en una solución saturada de Schultze (KClO<sub>3</sub> en HNO<sub>3</sub>, 60%)</li> <li>• Limpieza con agua destilada.</li> <li>• Montaje en resina plástica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fósiles en roca matriz de caliza.</li> <li>• Desprendimiento de la cutícula con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 50% durante 2-24 h.</li> <li>• Extracción de las cutículas con aguja de disección.</li> <li>• Limpieza con NaOH al 5%, 10 min.</li> <li>• Tinción de la cutícula con safranina al 1%.</li> <li>• Montaje en gelatina glicerizada.</li> </ul>

El material fósil trabajado es de características diversas en cuanto a la composición, edad y tipo de hojas contenidas, por ende las técnicas que se consultaron bibliográficamente tuvieron que ser modificadas para su aplicación de acuerdo a cada localidad (Tabla 2).

**Tabla 3.** Modificaciones y resultados de las técnicas aplicadas a cada localidad.

Localidad	Técnica	Especificaciones	Modificaciones	Resultados
Ixtapa (Mioceno) ANGIOSPERMAS/ limonita	Schultze (Kerp, 1991)	La roca portadora se desintegra en una solución de HCl 1 N y se elimina el exceso de carbón con solución de Schultze y limpieza de ácidos con agua destilada.	Las hojas fósiles se sumergieron directamente en solución Schultze. Extracción de la impronta libre de carbón con acetato de celulosa y desintegración del mismo con acetona, montaje y observación.	La solución de Schultze elimina todo el carbón del fósil, dejando al descubierto patrones de venación, glándulas y tricomas. El uso de acetatos de celulosa permite la extracción de fracciones de cutícula fósil.
	HNO <sub>3</sub> (Upchurch, 1995)	Eliminación del carbón de la impronta con solución 1:1 de HNO <sub>3</sub> , eliminación de ácido con NaOH al 5%.	Con ayuda de agujas se libera la cutícula de la roca portadora y con acetona se desprende una segunda capa de cutícula, tinción con safranina, montaje y observación.	Con el uso de la acetona se desprenden porciones de cutícula más grandes y con NaOH al 5% se elimina por completo el exceso de sedimentos aun contenidos en la cutícula.
El Chango (Cretácico) GIMNOSPERMAS/ caliza	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Aucour y Anne-Marie, 2009)	La roca portadora se desintegra con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 37% y se elimina el carbón con solución de Schultze.	Se utilizó H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 50% para liberar las hojas fósiles de la roca caliza y con NaOH al 5%, se limpiaron las cutículas para después teñirlas y montarlas.	El peróxido libera las hojas fósiles y el uso de NaOH limpia por completo el resto de carbón evitando el uso de solución de Schultze, es importante desdoblar cuidadosamente las hojas fósiles para un mejor montaje.

Las modificaciones realizadas a las técnicas se basan en la composición de roca portadora y a las características de las hojas fósiles. Cada técnica comprende tres pasos fundamentales: primero; la limpieza y eliminación del carbón, segundo; la separación de la cutícula fósil de la roca portadora y por último; la eliminación del resto de sedimentos de la cutícula libre. El diagrama de flujo (Figura 8) representa el método modificado.

Técnicas para la extracción de cutículas fósiles.

Andrea Porras Carrasco

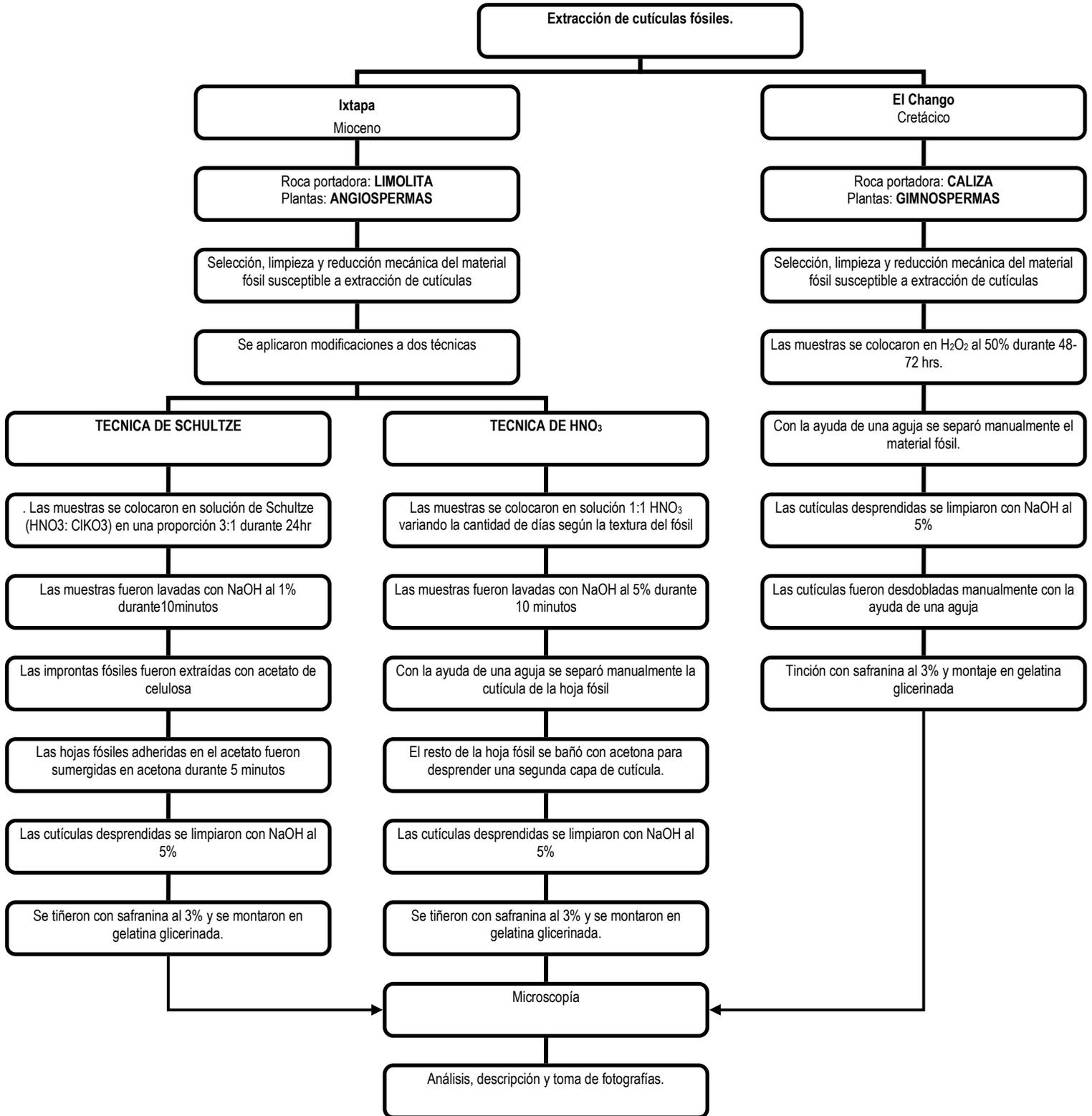
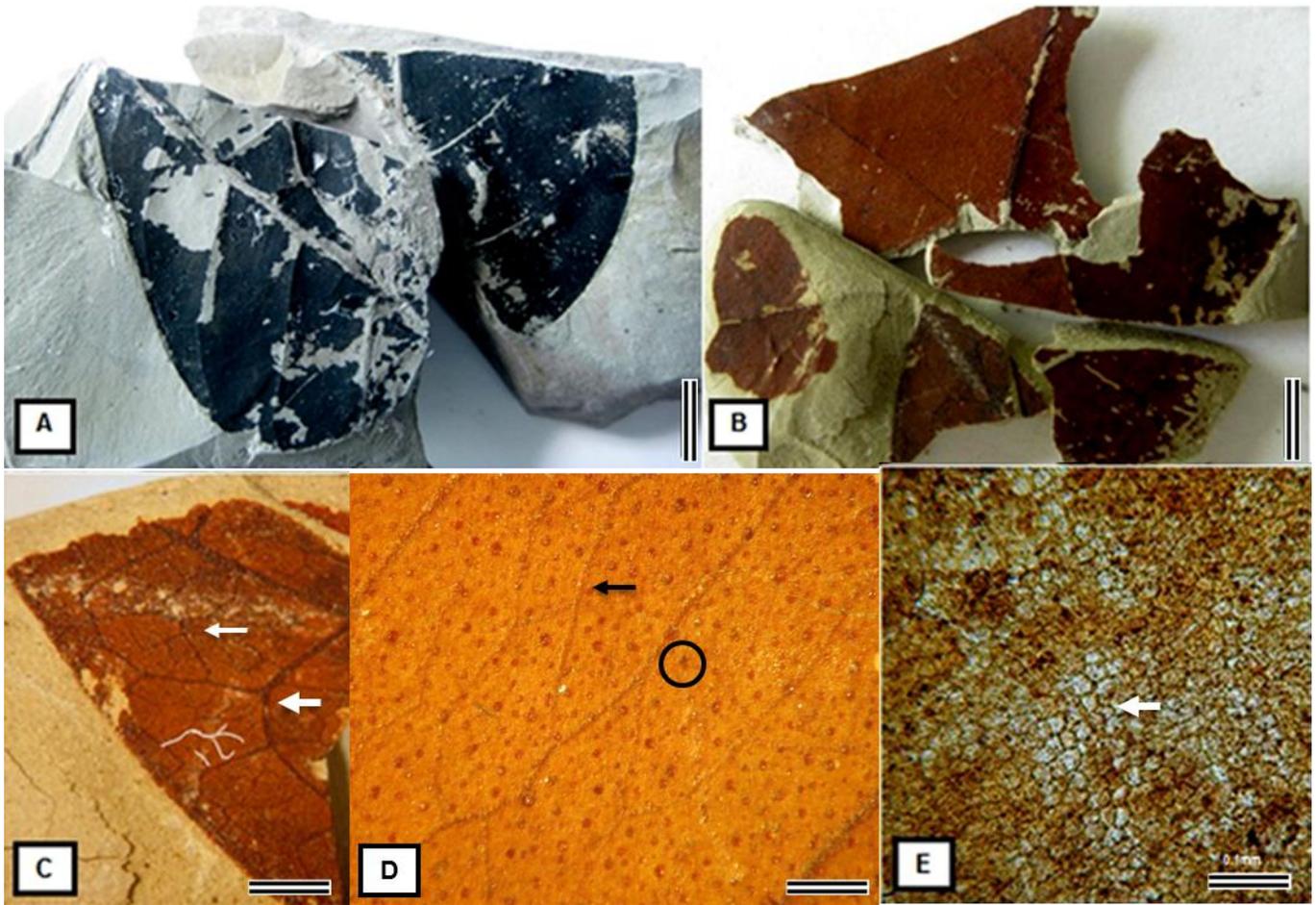


Figura 8. Diagrama de flujo que muestra la metodología empleada en la extracción de cutículas fósiles.

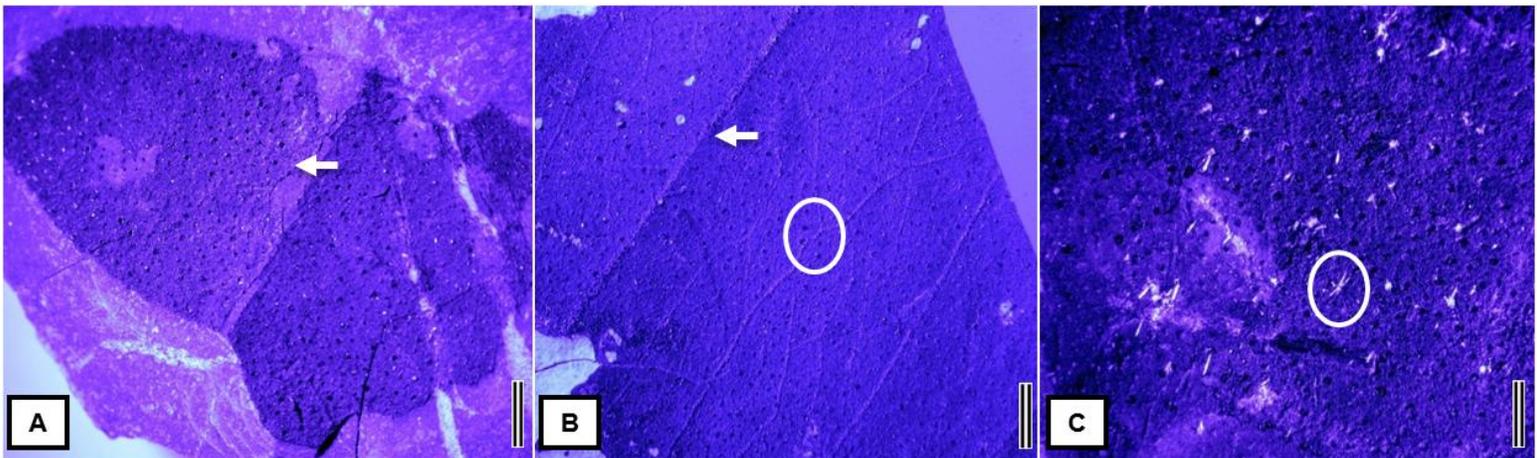
## VIII.I Proceso químico para la extracción de cutículas.

### A. Técnica de Schultze (Modificado de Kerp, 1991).

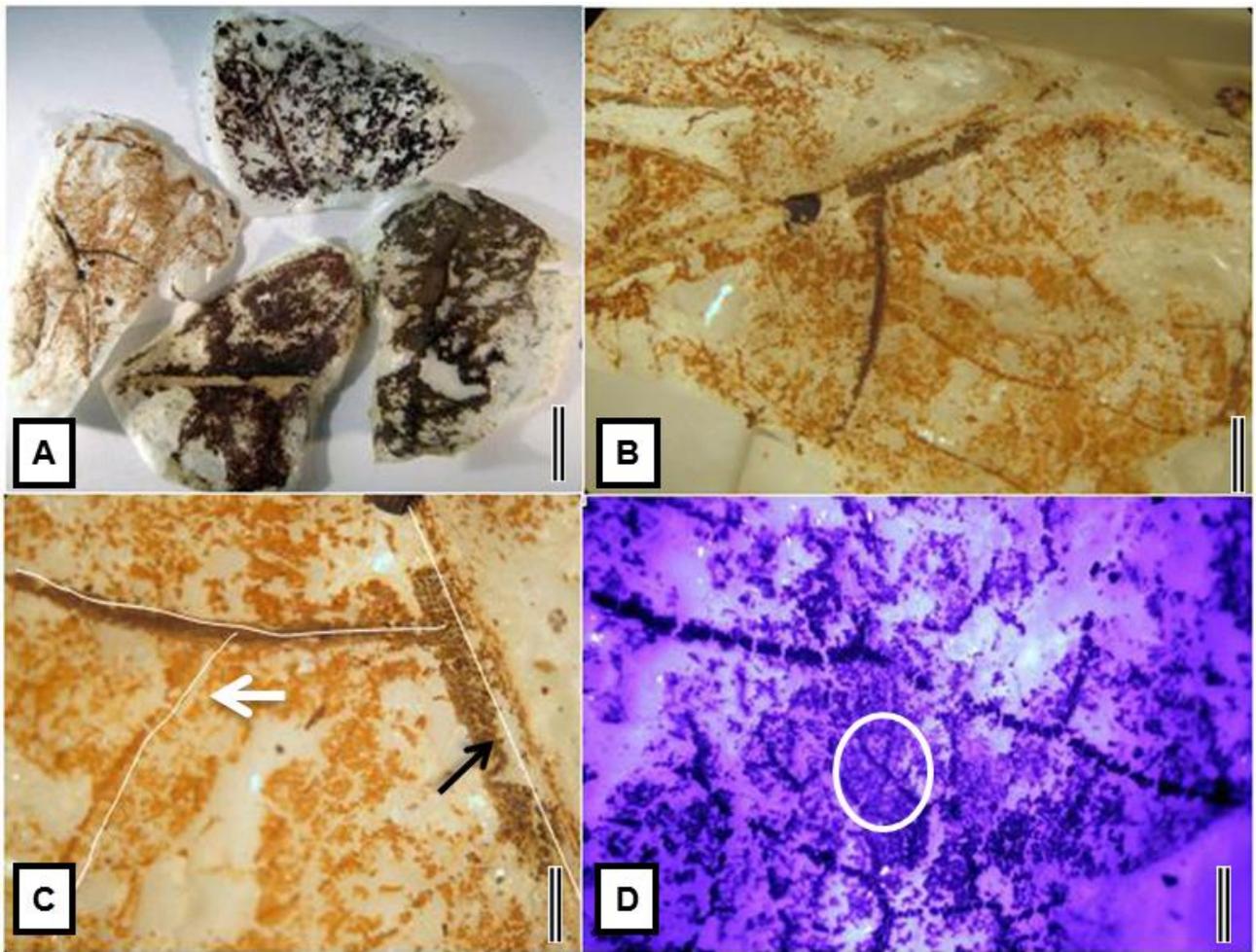
- I. El material fósil contenedor de cutículas vegetales se sometió a solución de Schultze ( $\text{HNO}_3$ :  $\text{ClKO}_3$ ) en una proporción 3:1 durante 45 min y hasta 1h para reducir el carbón a ácidos húmicos.
- II. Se lavaron y trataron con NaOH al 1% durante 10 min, para eliminar los restos de carbón adheridos y lavar los restos ácidos.
- III. Se separaron los fósiles del exceso de limolita, seleccionando el material contenedor de cutículas vegetales (Lámina 1).
- IV. Se realizaron observaciones bajo el microscopio de luz UV para observar el relieve de los patrones de venación de la hoja fósil limpia de carbón (Lamina 2).
- V. Del material limpio de carbón, fueron extraídas con una película de acetato de celulosa las cutículas de las hojas fósiles (Lámina 3).
- VI. Las hojas fósiles adheridas en el acetato fueron sumergidas en acetona durante 5 minutos para separarlas del acetato.
- VII. Las fracciones de cutículas fósiles desprendidas se colocaron en NaOH al 5% para eliminar el sobrante de carbón.
- VIII. Las cutículas se tiñeron con safranina O al 3% durante 5 minutos.
- IX. Se lavó con agua destilada el excedente de colorante.
- X. Las cutículas teñidas se montaron en gelatina glicerizada.
- XI. Se eliminó el exceso de gelatina glicerizada y colorante de la preparación, para ser etiquetada adecuadamente.
- XII. Empleando un microscopio óptico *Zeiss® Primo Stary* técnicas de iluminación se observaron caracteres morfológicos cuticulares (Lámina 4).



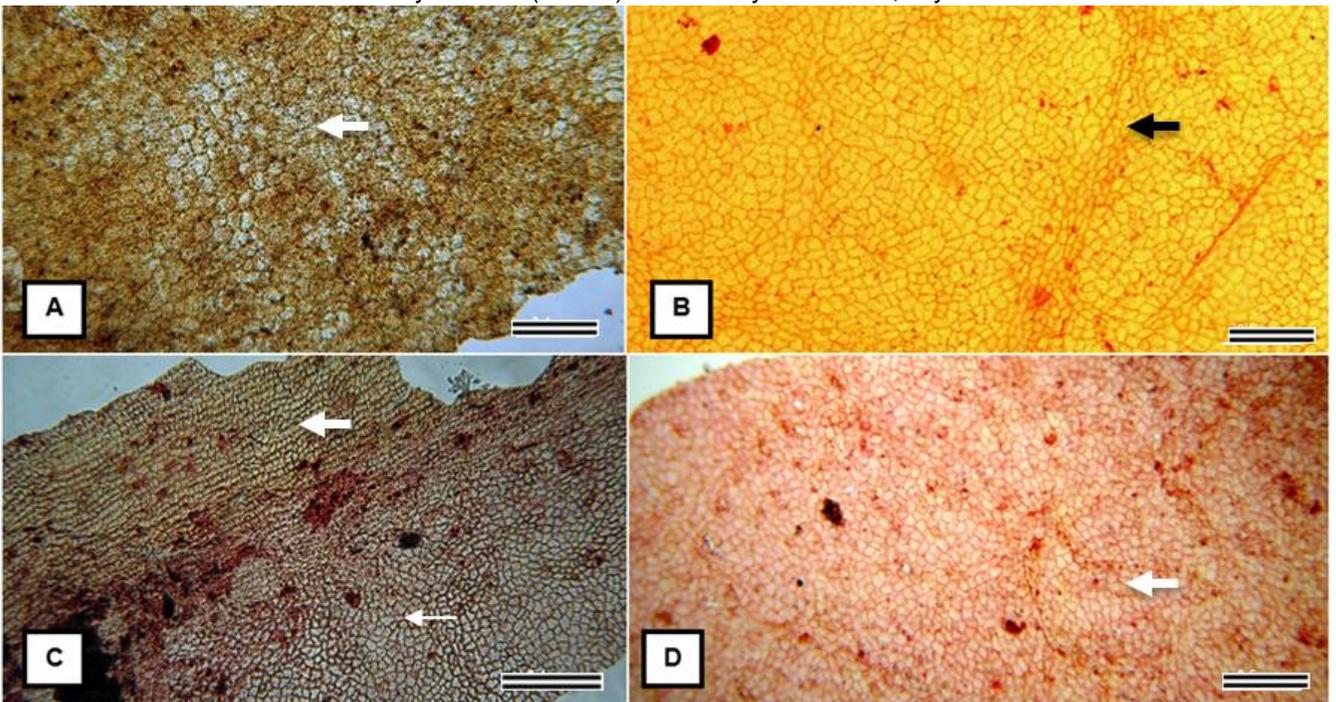
**Lámina 1. Localidad Ixtapa.** A. Hojas fósiles con carbón en matriz de lutita. B. Fragmentos de hojas fósiles tratados con solución de Schultze y limpios de carbón. C. Acercamiento de hoja fósil con venación de primer (flecha gruesa), segundo orden (flecha delgada), venación terciaria reticular y vénulas (escala 0.5 cm). D. Detalle de la venación (flecha) y glándulas de la epidermis (círculo). E. Cutícula fósil extraída y limpia de carbón, impresión de células epidérmicas (flecha). Escalas A= 2.0 cm, B= 1.0 cm, C y D= 0.5 cm, E= 0.1 mm.



**Lámina 2 Localidad Ixtapa.** Fragmentos de hojas fósiles tratados con solución Schultze y limpios de carbón vistos con luz UV. A. Detalle de glándulas de la epidermis (flecha). B. Realce de los patrones de venación, venas de segundo y tercer orden (flecha), abundantes glándulas (círculo). C. Glándulas de la epidermis y tricomas estelares (círculo). Escala A y B= 1.0 cm, C= 0.5 cm.



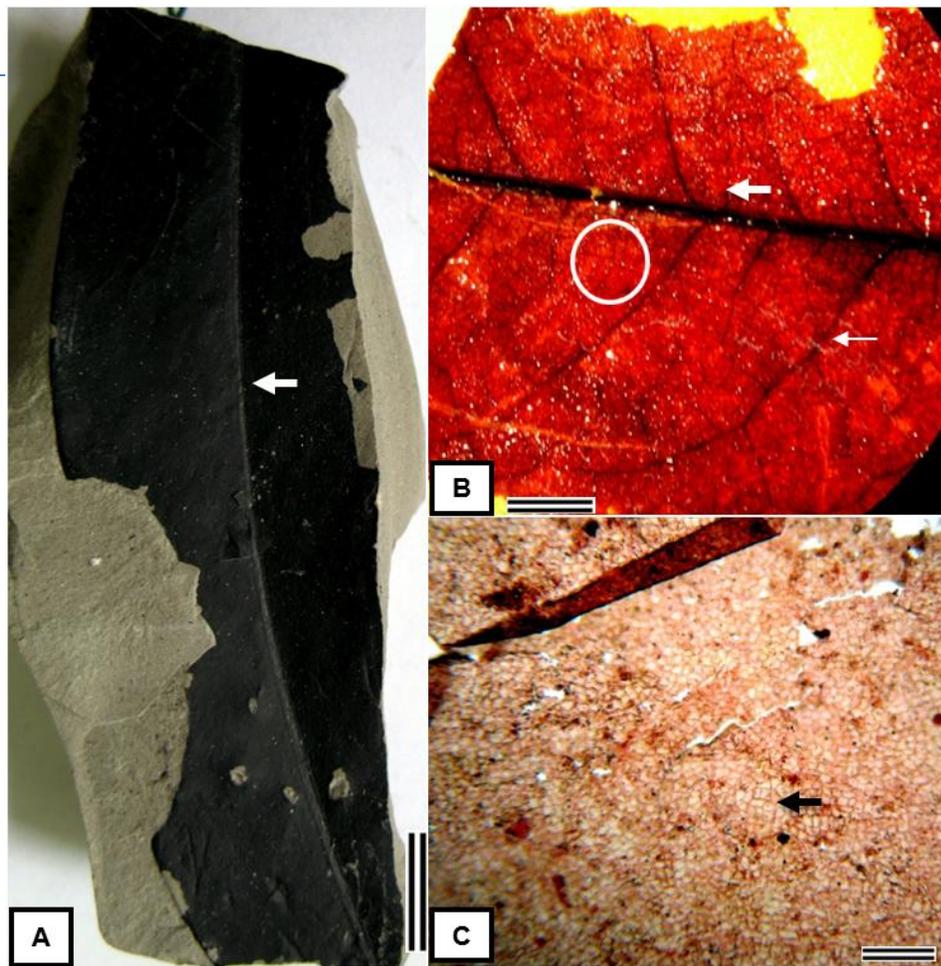
**Lámina 3 Localidad Ixtapa.** **A.** Improntas fósiles extraídas con acetato de celulosa. **B.** Acetatos tratados con solución de Schultze y limpios de carbón. **C.** Se observa venación primaria (flecha delgada) y secundaria (flecha gruesa). **D.** Detalle con luz ultravioleta de venación y areolas (circulo). Escala A y B= 1.0 cm, C y D= 0.5 cm.



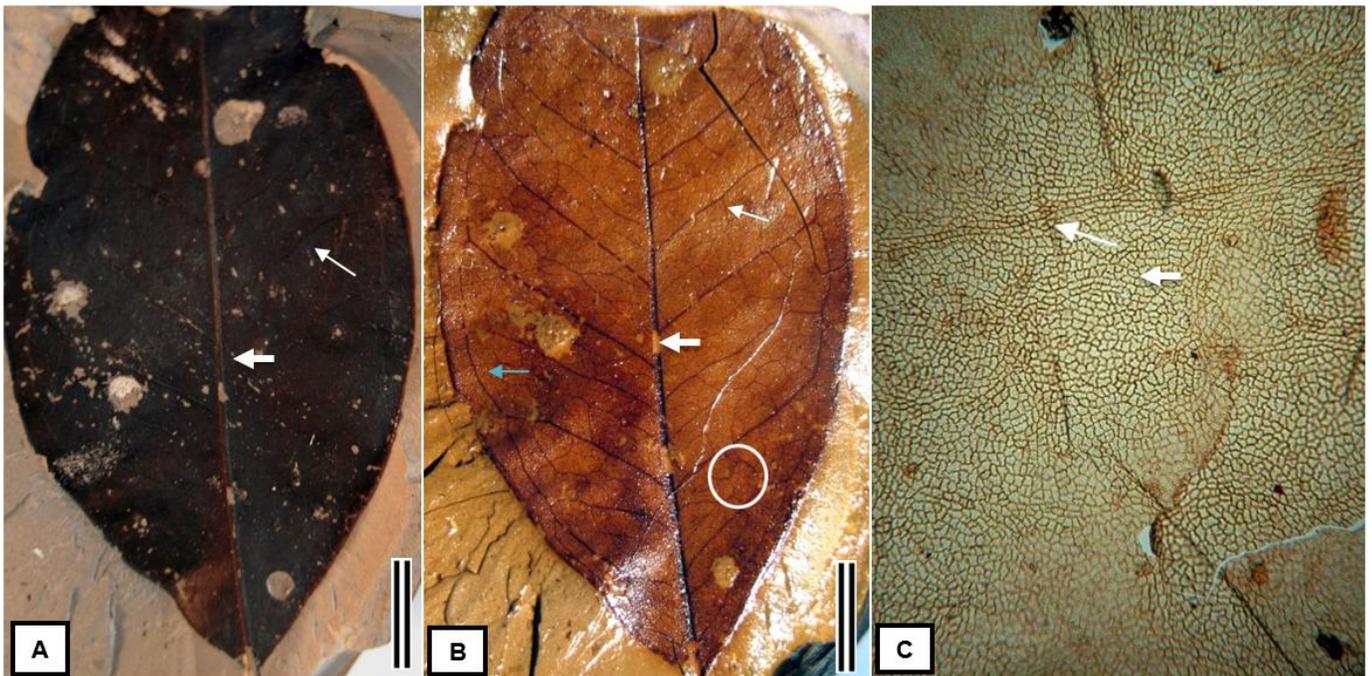
**Lámina 4 Localidad Ixtapa.** Cutículas fósiles extraídas con solución Schultze y acetatos de celulosa, **A.** Cutícula adaxial, impresión de células epidérmicas con paredes curvas (flecha), se observan restos de sedimentos. **B.** Cutícula adaxial, impresión de células epidérmicas con paredes curvas (flecha). **C.** Cutícula adaxial, impresión de células intercostales (flecha delgada) y células costales (flecha gruesa). **D.** Cutícula fósil con tinción safranina 3%, impresión de células epidérmicas (flechas). Escalas A, B y C= 0.1 mm, D= 0.5 mm.

## B. Técnica de HNO<sub>3</sub> (Modificado de Upchurch, 1995)

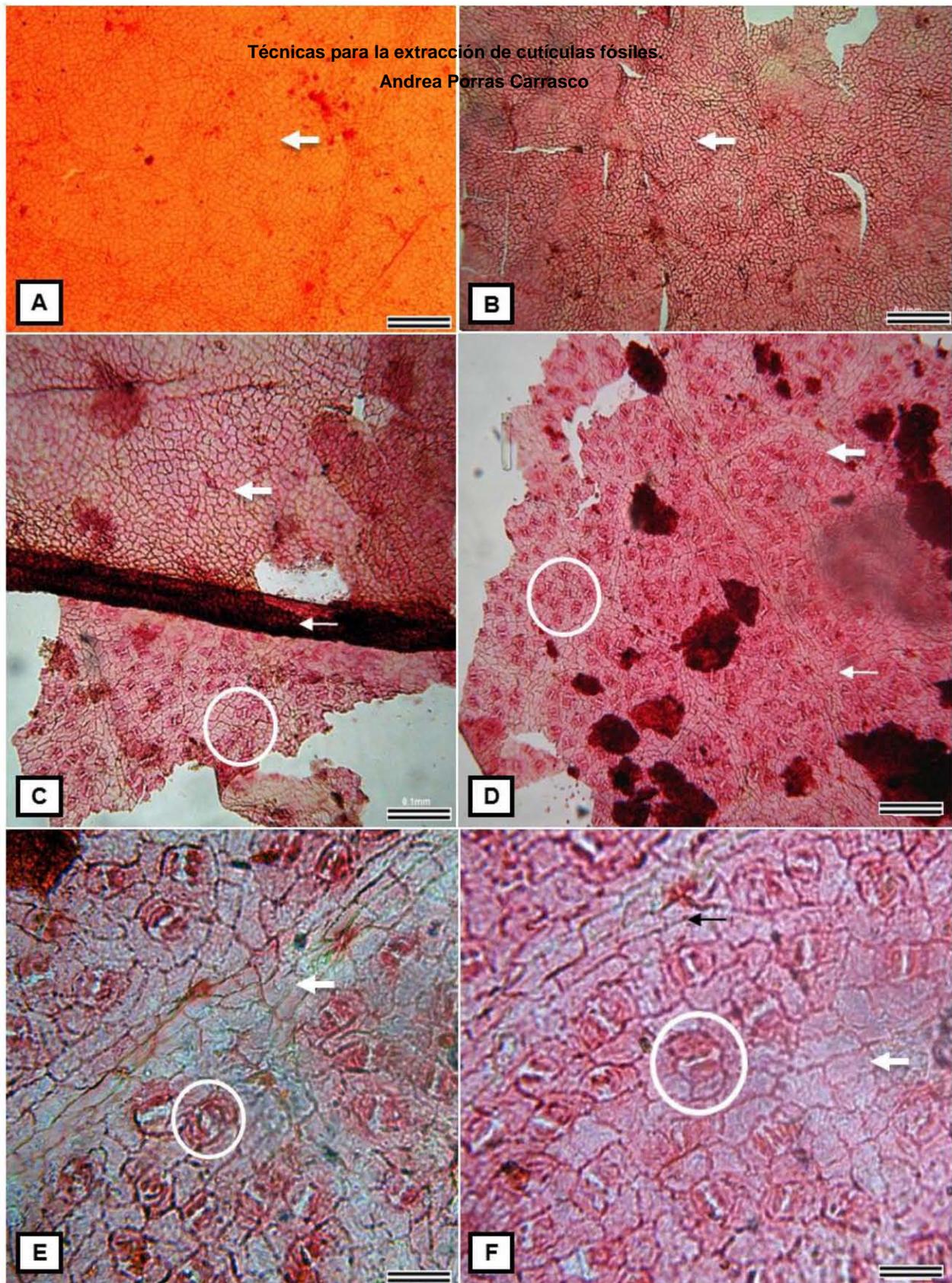
- I. El material fósil con cutículas vegetales fue sometido a una solución 1:1 de HNO<sub>3</sub> variando la cantidad de días dependiendo de la textura del fósil para reducir el carbón a ácidos húmicos, logrando la separación de la cutícula de la roca portadora (Láminas 5 y 6).
- II. Se lavaron y trataron con NaOH, al 5% durante 10 min, para eliminar los residuos ácidos.
- III. Aún con la solución de NaOH, bajo un estereoscopio *Zeiss® Stemi DV4y* con la ayuda de agujas de disección y pinzas se desprendió la delgada cutícula fósil.
- IV. Se bañó con acetona el resto de la hoja fósil y con la ayuda de una aguja de disección se fue desprendiendo una segunda capa de cutícula.
- V. Las fracciones de cutículas fósiles desprendidas se colocaron en NaOH al 5% para eliminar el sobrante de carbón.
- VI. Las cutículas se tiñeron con safranina O al 3% durante 5 min.
- VII. Se lavó con agua destilada el excedente de colorante.
- VIII. Las cutículas teñidas se montaron en gelatina glicerinada.
- IX. Se eliminó el exceso de gelatina glicerinada y colorante de la preparación, para ser etiquetada adecuadamente.
- X. Empleando un microscopio óptico y técnicas de iluminación se observaron las cutículas fósiles (Lámina 7).
- XI. Las muestras se fotografiaron con una cámara digital y se elaboraron láminas fotográficas.



**Lámina 5 Localidad Ixtapa.** Técnica  $\text{HNO}_3$ . **A.** Hoja fósil de angiosperma en matriz de lutita, se observa el alto contenido de carbón y vena primaria (flecha). **B.** Limpieza de carbón con  $\text{HNO}_3$ , se observan venas de primer (flecha gruesa), segundo (flecha delgada) y hasta tercer orden (circulo). **C.** Cutícula extraída y limpia de sedimentos, teñida con safranina al 3%, se observan impresiones de las células epidérmicas (flecha). Escalas A= 1.5 cm, B= 1.0 cm C= 0.1 mm



**Lamina 6 Localidad Ixtapa.** Técnica  $\text{HNO}_3$ . **A.** Hoja fósil angiosperma en matriz de lutita, alto contenido de carbón, venas de primer (flecha gruesa) y segundo orden (flecha delgada). **B.** Limpieza de carbón con  $\text{HNO}_3$ , venas de primer (flecha gruesa), segundo (flecha delgada) y hasta tercer orden, venas del margen (flecha azul) y vénulas (circulo). **C.** Cutícula extraída y limpia de sedimentos, impresiones de las células epidérmicas (flecha). Escalas A y B= 1.0 cm, C= 0.1 mm.

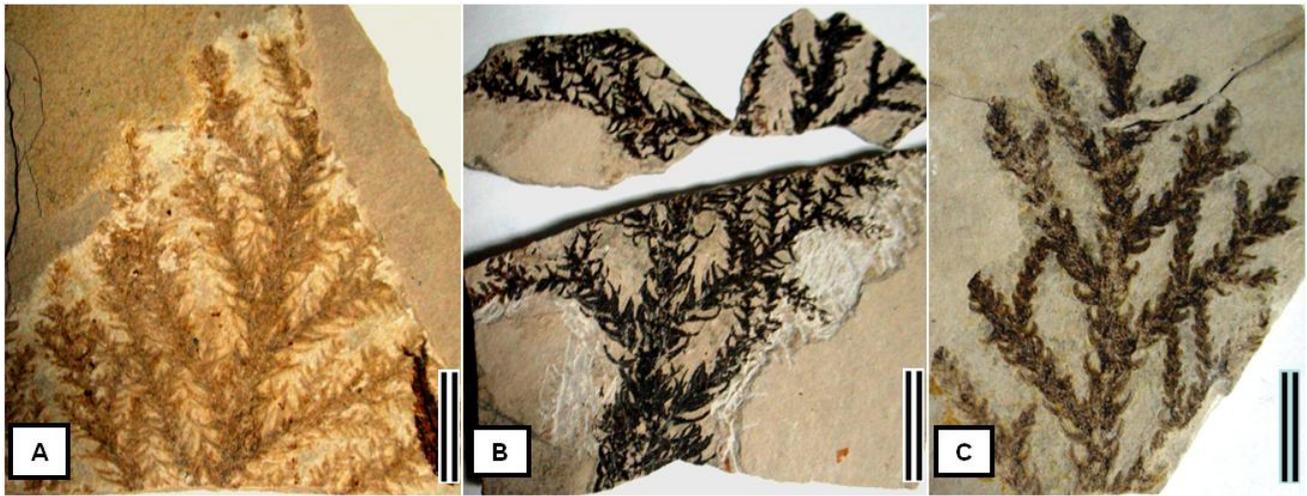


**Lámina 7 Localidad Ixtapa.** Técnica  $\text{HNO}_3$ , hojas fósiles angiospermas **A.** Cutícula adaxial, impresión de células epidérmicas rectangulares (flecha gruesa). **B.** Cutícula abaxial, impresión de células epidérmicas rectangulares (flecha). **C.** Cutícula abaxial y adaxial, se observa el margen de la hoja con células epidérmicas pequeñas de paredes gruesas (flecha delgada), células epidérmicas rectangulares (flecha delgada) y aparatos estomáticos (círculo). **D.** Aparatos estomáticos a lo largo de la epidermis (círculo), células costales (flecha). **E** y **F** Aparatos estomáticos (círculos) paralelos a la nerviación distribuidos de manera lineal y orientados en disposición a las células costales (flechas). Escalas A, B, C y D= 0.1 mm, E y F= 0.05 mm.

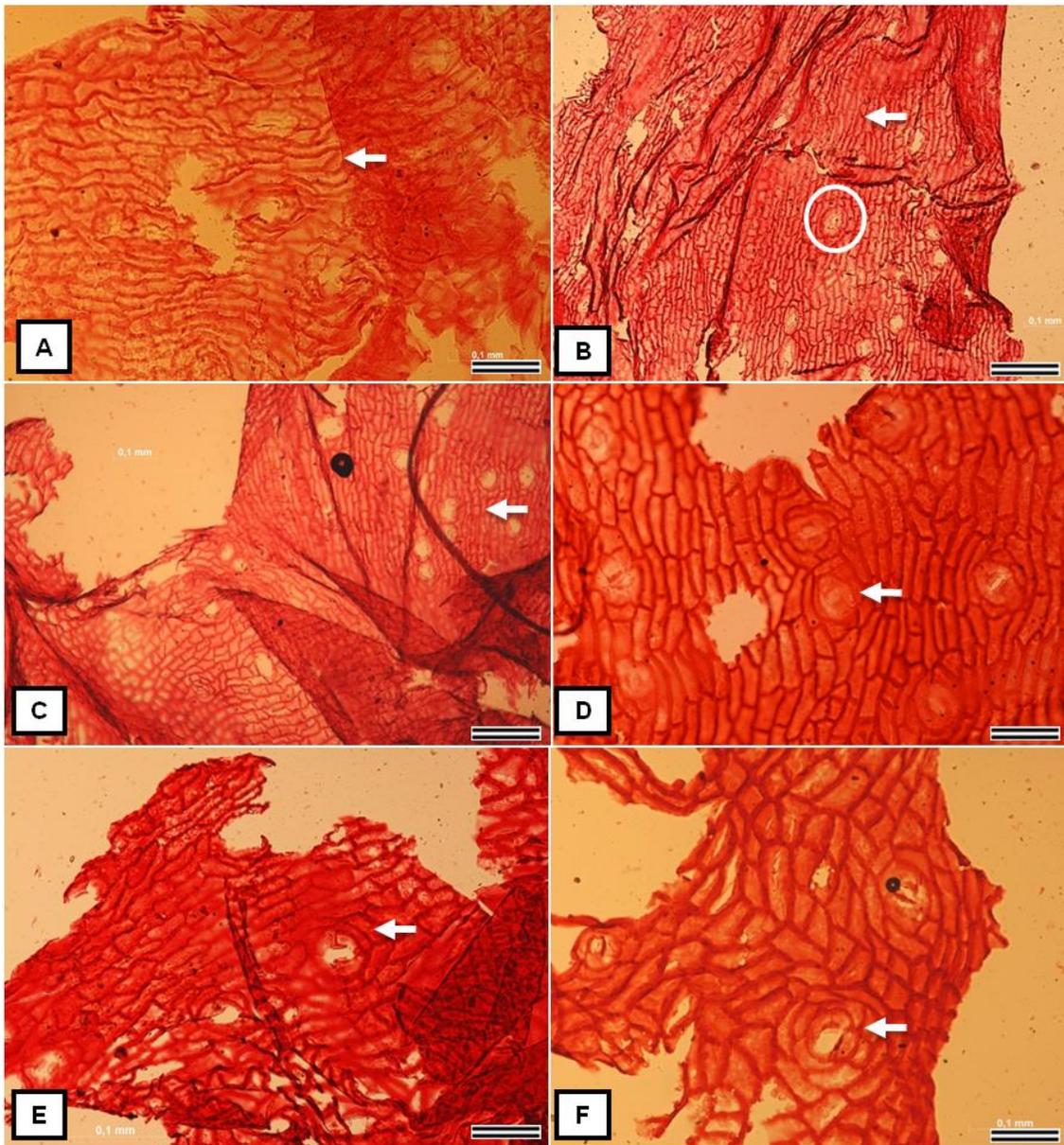
En el caso de la localidad El Chango se recurrió a la técnica de Aucour y Anne Marie (2009) con adecuaciones para la aplicación en el material fósil, hojas de gimnospermas en roca matriz caliza (Lámina 8).

### **C. Técnica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Modificado de Aucour y Anne Marie, 2009).**

- I. Los fósiles altamente carbonizados se colocaron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 50% durante 24 h y hasta 48 h dependiendo del contenido de sedimento, para eliminar el exceso de roca.
- II. Aun en el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y con la ayuda de una aguja de disección y pinzas se separaron los restos fósiles de la roca caliza portadora, desprendiendo el material contenedor de cutículas vegetales.
- III. Las hojas desprendidas se colocaron en una solución de NaOH al 5% durante 20 min para eliminar el carbón y sedimentos adheridos a la cutícula.
- IV. Las cutículas limpias inmersas en la solución de NaOH y bajo un microscopio estereoscopio se desdoblaron cuidadosamente con la ayuda de agujas de disección y pinzas.
- V. Las fracciones de cutículas fósiles se extendieron y colocaron en NaOH al 5% para eliminar el sobrante de carbón.
- VI. Las cutículas se tiñeron con safranina O al 3% durante 5 min.
- VII. Se lavó con agua destilada el excedente de colorante.
- VIII. Las cutículas teñidas se montaron en gelatina glicerinada.
- IX. Se eliminó el exceso de gelatina glicerinada y colorante de la preparación, para ser etiquetada adecuadamente.
- X. Empleando un microscopio óptico y técnicas de iluminación se observaron las cutículas (Lámina 9) y se fotografiaron.



**Lamina 8 El Chango.** Técnica de  $H_2O_2$  en fósiles de gimnospermas. **A. B. y C.** Hojas fósiles de *Cupressaceae* con diferentes grados de carbón en matriz de caliza. Escala A, B y C= 2.0 cm.



**Lámina 9 Localidad El Chango.** Técnica de  $H_2O_2$  aplicada en hojas fósiles de gimnospermas. **A. y B.** Cutícula fósil, impresión de patrón epidérmico mostrando células epidérmicas rectangulares alargadas con paredes gruesas (flechas) y aparatos estomáticos (círculo). **C.** Se observan múltiples espacios circulares (flecha) a lo largo de la cutícula. **B. E. y F.** Cutículas con impresión de células epidérmicas rectangulares alargadas con paredes rectas y gruesas, aparatos estomáticos (flechas). Escalas A, B, C, D, D, E, y F= 0.1 mm.

## Cutículas de plantas actuales

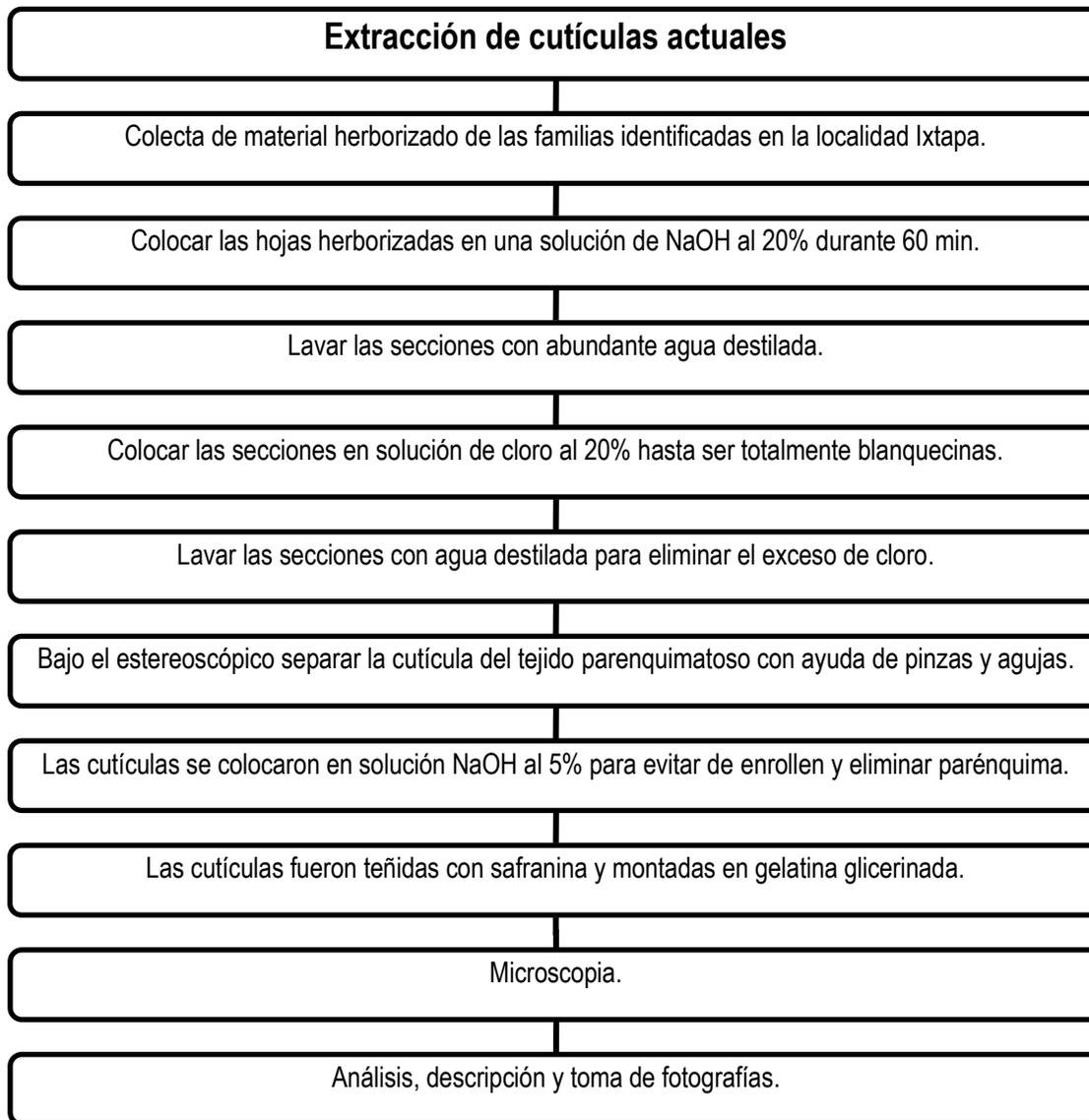
Se realizó la extracción de cutículas de hojas actuales de Myrtaceae, Moraceae y Rutaceae, ya identificadas en el registro fósil de la localidad miocénica de Ixtapa de acuerdo a Peralta-Medina (2009) y Hernández-Villalva (2011 com. pers).

**D. Técnica de extracción de epidermis de hojas actuales con Hidróxido de sodio/safranina O, cutículas** (Modificado de Sandoval, et. al, 2005) (Figura 8): Esta técnica permite observar la forma y tamaño de las células epidérmicas, orientación de las mismas, ornamentaciones cuticulares, tricomas, papilas, aparatos estomáticos y cristales.

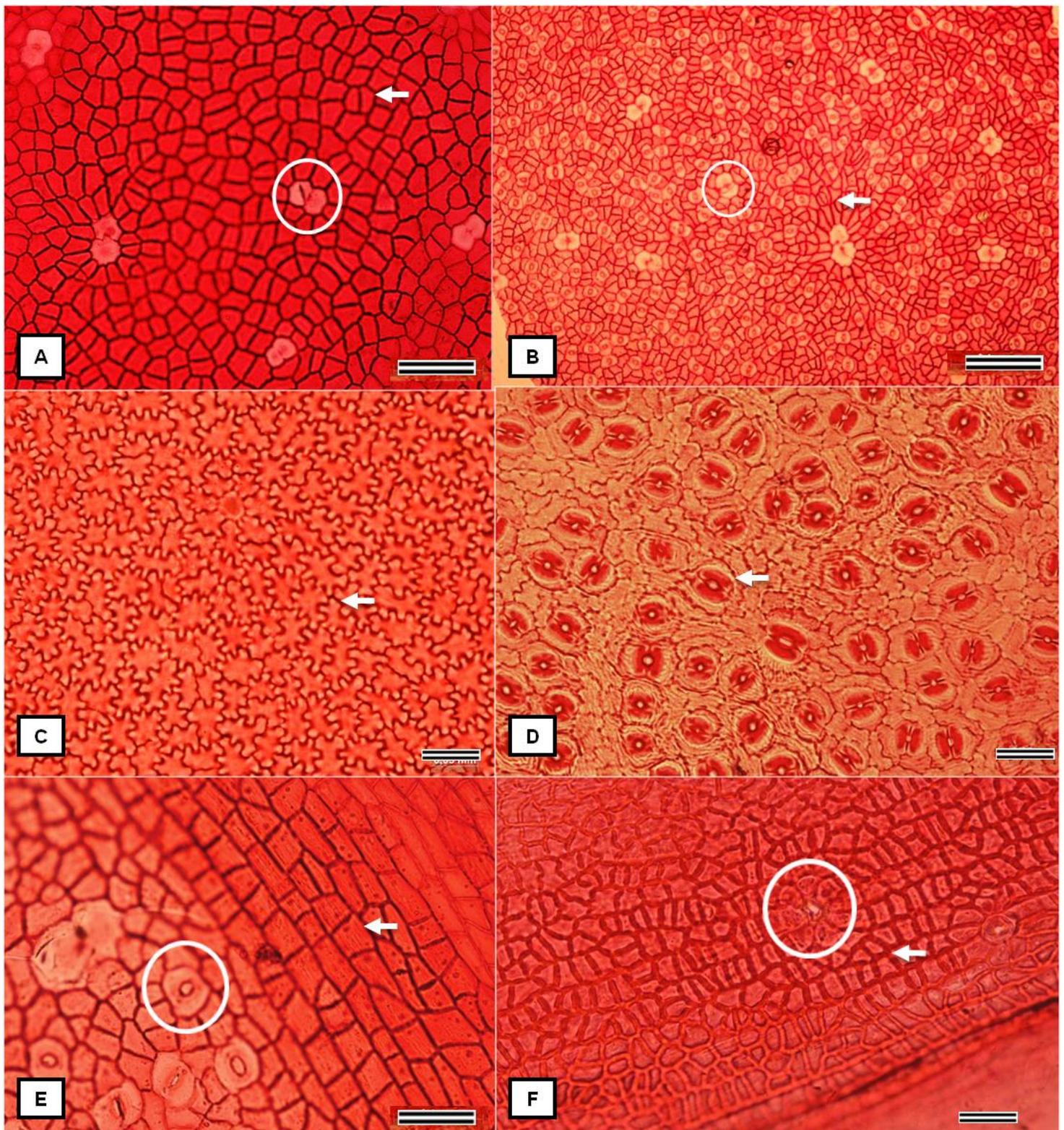
Se obtuvo material herborizado colectado de algunas zonas del Edo de Chiapas y el MEXU.

- I. Se colocaron las hojas del material herborizado en una solución de NaOH al 20% de 20 a 60 min de acuerdo a la textura de la hoja.
- II. Se lavaron las secciones con abundante agua destilada y se colocaron en cloro comercial al 20% durante 30 min o hasta que se tornaron completamente blanquecinas.
- III. Se lavaron las secciones varias veces con agua destilada para eliminar el exceso de cloro.
- IV. El material se colocó en cajas petri y bajo el microscopio estereoscópico se separó la cutícula del tejido parenquimatoso con ayuda de pinzas y agujas de punta fina.
- V. Las secciones de cutícula se colocaron en solución NaOH 5% para evitar que se enrollen. Se eliminó el excedente del tejido parenquimatoso.
- VI. Las cutículas se colocaron en safranina al 3% durante 10 min, y se lavó el excedente de colorante con agua destilada.
- VII. Las cutículas se montaron en gelatina glicerizada.
- VIII. Se eliminó el exceso de gelatina glicerina y colorante de la preparación, para ser etiquetada adecuadamente.
- IX. Empleando un microscopio óptico y técnicas de iluminación se observaron las cutículas y se fotografiaron.

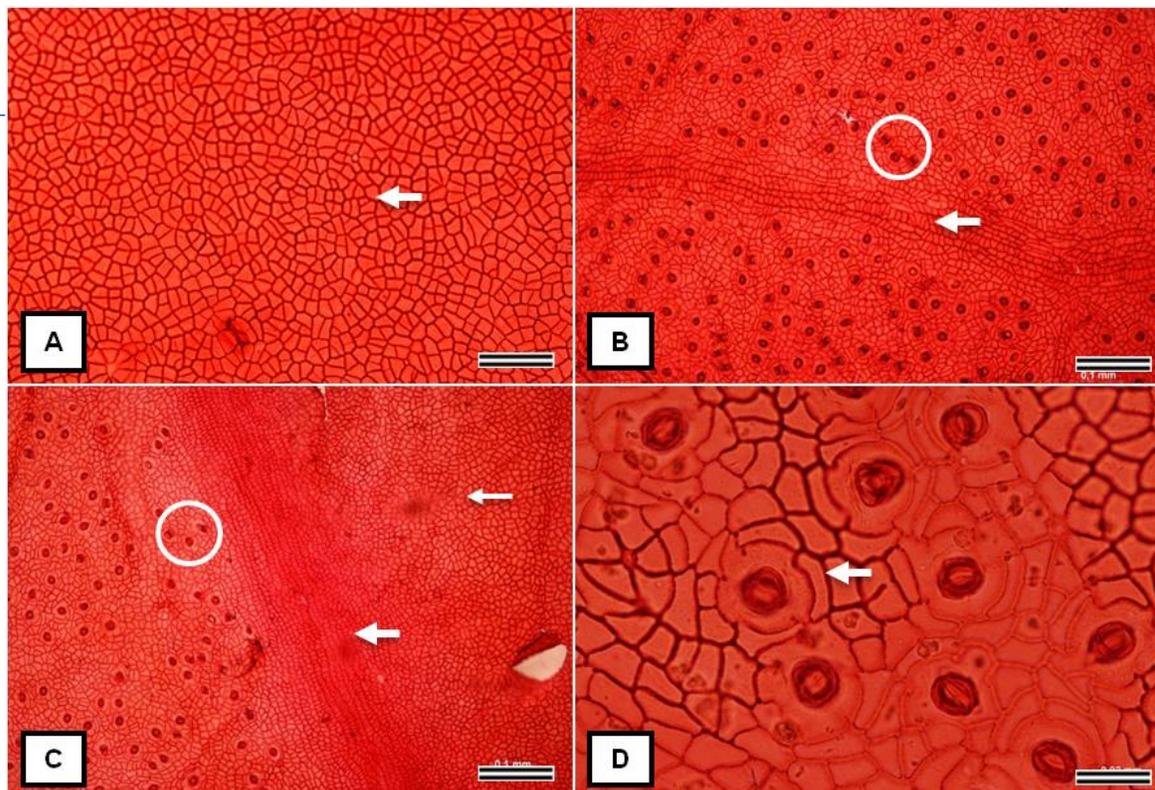
- X. Se utilizó el programa *Adobe®PhotoShop 7.0* para la elaboración de láminas fotográficas, utilizando herramientas de contraste en los aparatos estomáticos para su posterior identificación (Láminas 16, 17 y 18 )



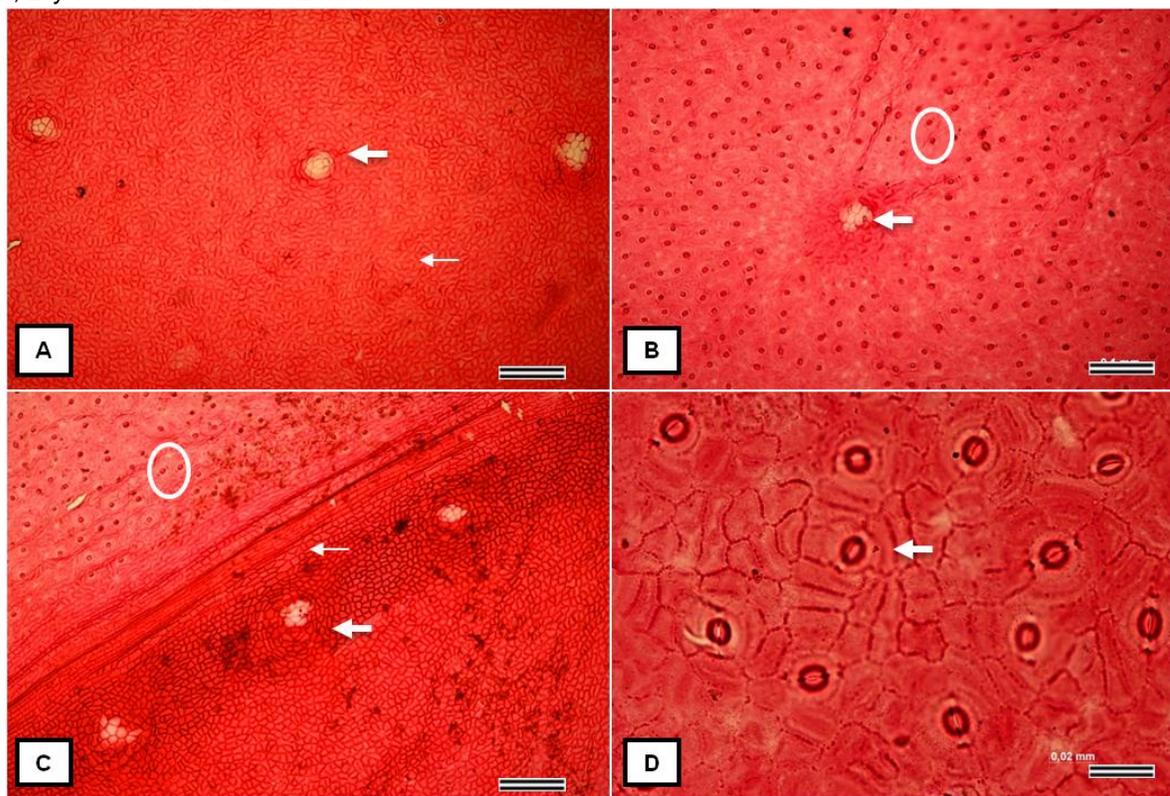
**Figura 8.** Diagrama de flujo de la metodología en la extracción de cutículas actuales, (Sandoval, et al., 2005)



**Lámina 10 Cutículas actuales.** Cutículas extraídas de Myrtaceae. **A.** *Eugenia biflora*. Cutícula adaxial, células epidérmicas poligonales (flecha) y bases de tricomas (círculo). **B.** Cutícula abaxial, células epidérmicas poligonales (flecha) y aparatos estomáticos (círculo). **C.** *Eugenia myrtifolia*. Cutícula adaxial, células epidérmicas con paredes sinuosas (flecha). **D.** Cutícula abaxial, células epidérmicas con paredes sinuosas y aparatos estomáticos (flecha) con arreglo heterogéneo. **E.** *Eugenia biflora*, células costales (flecha) y aparatos estomáticos (círculo). **F.** Sección de cutícula correspondiente a las células costales, células intercostales (flecha) y bases de tricomas (círculo). Escala A, B y E= 0.1 mm, C y D= 0.05 mm, F= 0.02 mm.



**Lámina 11 Cutículas actuales.** Cutícula *Ficus sp.*, familia Moraceae. **A.** Cutícula adaxial, células epidérmicas poligonales (flecha). **B.** Cutícula abaxial, células costales (flecha) y aparatos estomáticos (circulo) paralelos a la nerviación distribuidos heterogéneamente. **C.** Cutícula abaxial y adaxial, se observan células costales (flecha gruesa) y células intercostales (flecha delgada), y aparatos estomáticos (circulo). **D.** Aparatos estomáticos (flecha). Escala A= 0.02 mm, B y C= 0.1 mm. D= 0.02 mm.

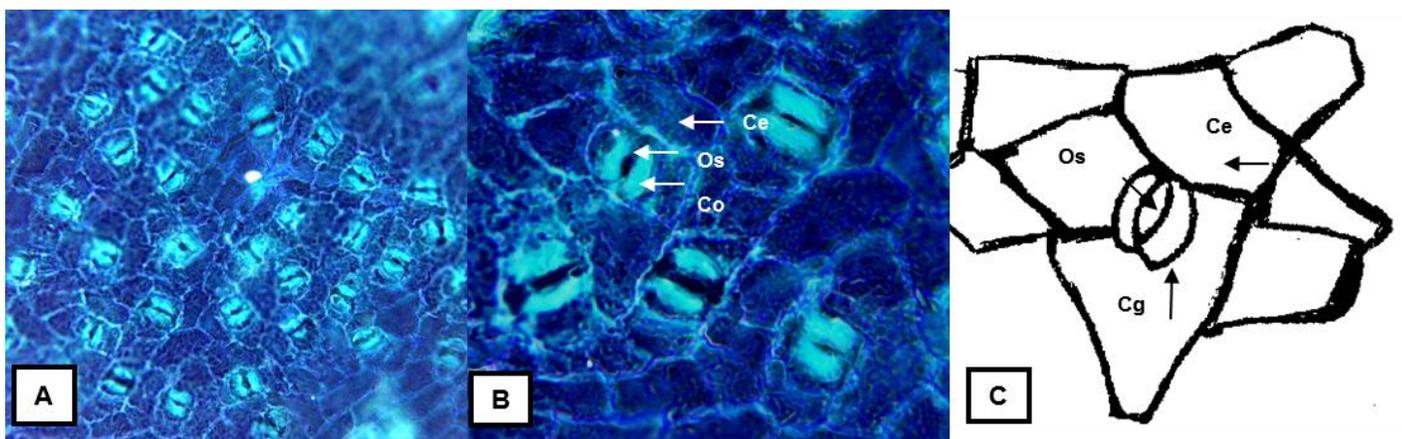


**Lámina 12 Cutículas actuales.** Cutícula de *Citrus sp.* Familia Rutaceae. **A.** Cutícula adaxial, células epidérmicas rectangulares (flecha delgada) y glándulas (flecha gruesa) a lo largo de la epidermis. **B.** Cutícula abaxial, células epidérmicas rectangulares y aparatos estomáticos (circulo) distribuidos heterogéneamente, detalle de glándula (flecha). **C.** Cutícula abaxial y adaxial, se observa el margen de la hoja con células costales (flecha delgada), glándulas alineadas al margen (flecha gruesa) y aparatos estomáticos (circulo). **D.** Aparatos estomáticos (flecha). Escala A, B y C= 0.1 mm, D= 0.02 mm.

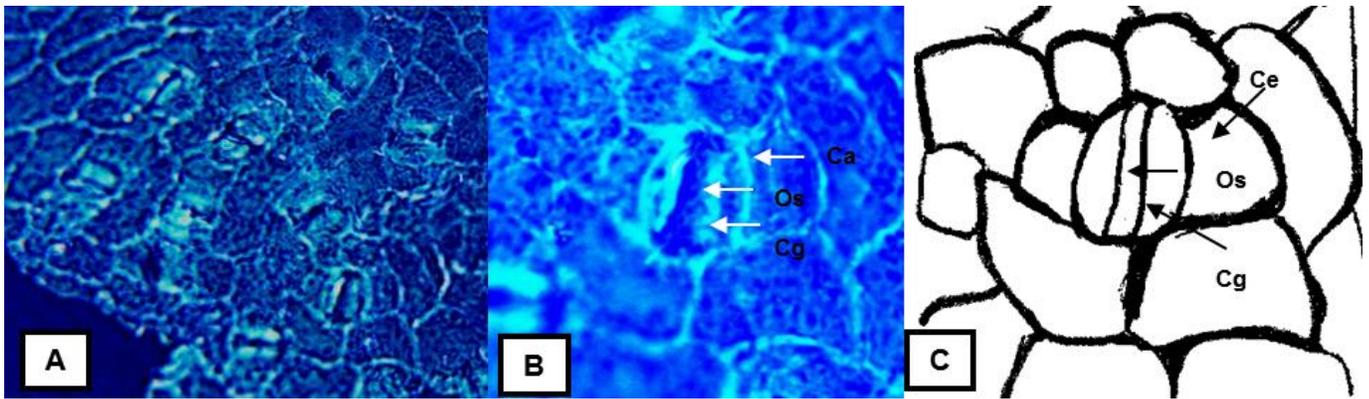
### VIII.II Aparatos estomáticos de cutículas fósiles.

Cada aparato estomático está formado por 2 células especializadas llamadas células guarda u oclusivas, que dejan entre sí una abertura llamada ostiolo o poro. En muchas plantas hay 2 o más células adyacentes a las células guarda y asociadas funcionalmente a ellas, estas células, morfológicamente distintas se llaman células anexas, subsidiarias o adjuntas.

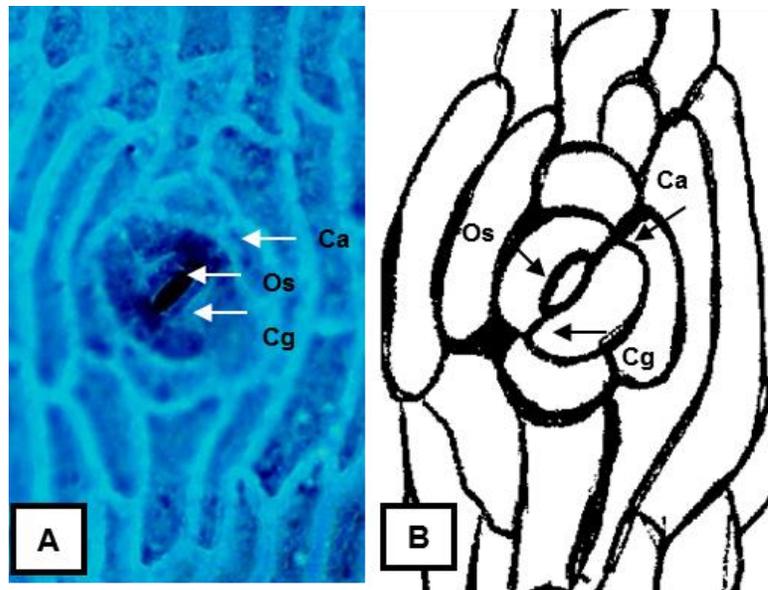
La formación de las células que conforman a las estomas comienza con las divisiones asimétricas celulares, la célula madre se divide produciendo las células guarda, las cuales aumentan de tamaño y forman el ostiolo, sin embargo el origen de las células adyacentes es diverso, puede formarse a partir de la misma célula madre que da origen a las células guarda, o bien, por la división de otras células protodérmicas distintas a las células madre. De manera que la determinación de los aparatos estomáticos a un tipo estomático determinado hace necesario estudios ontogénicos para corroborar el origen de las células adyacentes, cuyo arreglo define las clasificaciones estomáticas. De manera que en este trabajo las asignaciones al tipo estomático es acorde a la morfología de las células epidérmicas que rodean a las células guarda. De tal forma fue posible la asignación morfológica de los estomas de las cutículas de angiospermas y gimnospermas fósiles, así como de aquellas angiospermas actuales.



**Lamina 13 Ixtapa.** **A.** Cutícula de angiosperma fósil, se observan aparatos estomáticos distribuidos heterogéneamente a lo largo de la cutícula. **B.** Aparato estomático, ostiolo (Os), las células guarda (Cg), y células epidérmicas (Ce) que encierran las células guarda. **C.** Esquema de aparato estomático, ostiolo (Os), células guarda (Cg) y células epidérmicas (Ca), este tipo de aparato estomático correspondería morfológicamente al tipo anomocítico.

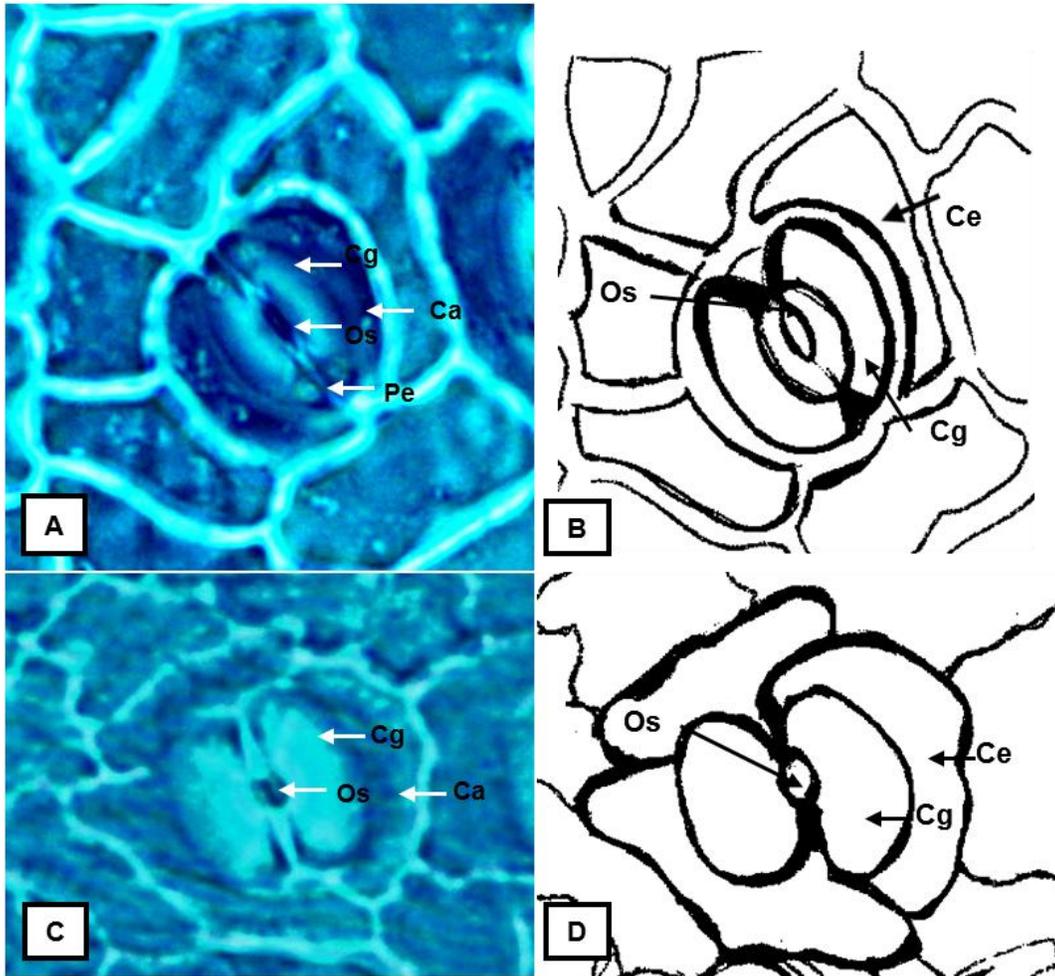


**Lamina 14 Ixtapa.** A. Cutícula de angiosperma fósil, se observan aparatos estomáticos distribuidos heterogéneamente a lo largo de la cutícula. B. Aparato estomático, se observa el ostiolo (Os), las células guarda (Cg), y cinco células epidérmicas (Ca) que engloban las células guarda, C Esquema de aparato estomático, ostiolo (Os), células guarda (Cg) y un anillo de células epidérmicas (Ce) que engloban a las células guarda, este tipo de aparato estomático correspondería morfológicamente al tipo ciclocítico.

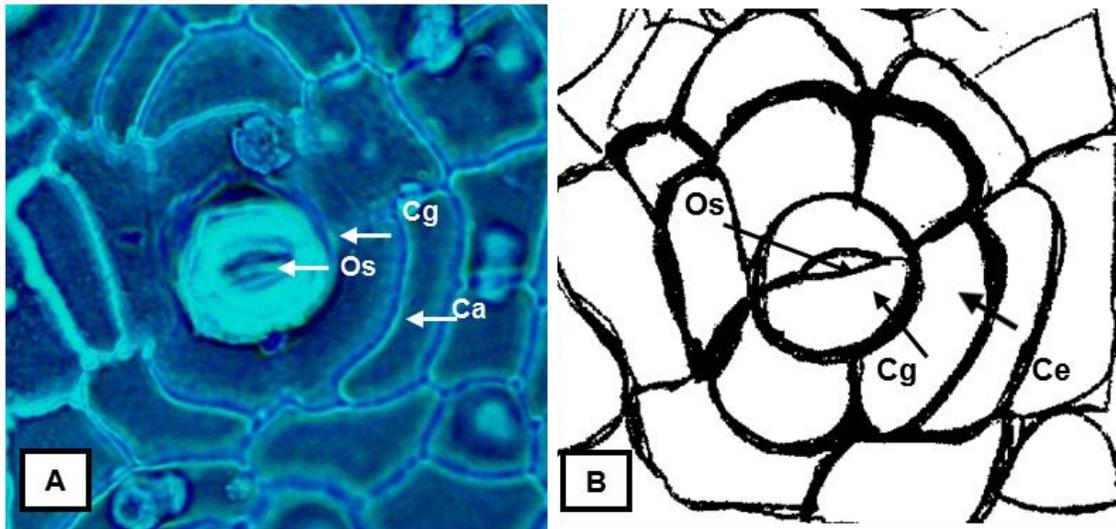


**Lamina 15 El Chango.** Cutícula de gimnosperma fósil. A. Aparato estomático de tipo ciclocítico de gimnosperma fósil, se observa el ostiolo (Os), las células guarda (Cg), y cinco células adyacentes (Ca) que engloban las células guarda, B Esquema de aparato estomático tipo ciclocítico, ostiolo (Os), células guarda (Cg) y un anillo de células adyacentes (Ca).

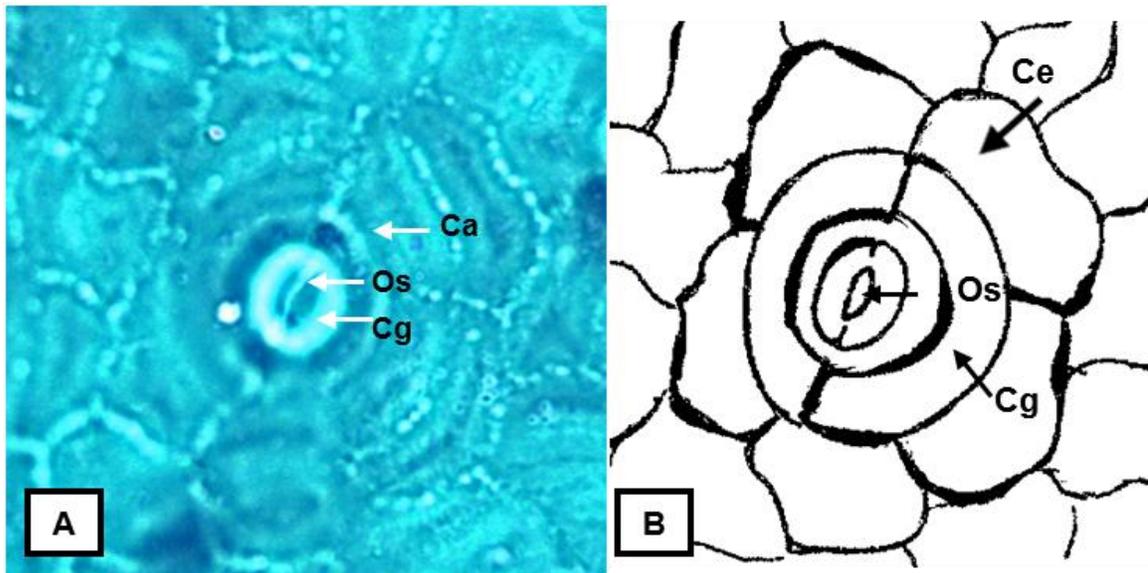
## VIII.III Aparatos estomáticos de cutículas actuales.



**Lamina 16.** Cutículas actuales del genero *Eugenia*, **Myrtaceae**. **A.** Aparato estomático, se observa el poro estomático u ostiolo (Os), las células guarda (Cg), dos células adyacentes (Ca) con su eje paralelo a lo largo del eje longitudinal de las células guarda y el polo estomático (Pe). **B.** Esquema de aparato estomático, se muestra el ostiolo (Os), células guarda (Cg) y células adyacentes (Ca), este tipo de aparato estomático correspondería morfológicamente al tipo paracítico. **C.** Aparato estomático, se observa el ostiolo (Os), dos células guarda (Cg), y tres células adyacentes (Ce) que encierran las células guarda. **D.** Esquema de aparato estomático, ostiolo (Os), células guarda (Cg) y células adyacentes, este tipo de aparato estomático correspondería morfológicamente al tipo anisocítico.



**Lamina 17.** Cutículas actuales de la familia **Moraceae**, genero **Ficus**. **A.** Aparato estomático, se observa el ostiolo (Os), las células guarda (Cg), y un anillo de células adyacentes (Ca) que engloban las células guarda, **B.** Esquema de aparato estomático tipo, ostiolo (Os), células guarda (Cg) y un anillo de células adyacentes (Ca), este tipo de aparato estomático correspondería morfológicamente al tipo ciclocítico.



**Lamina 18.** Cutículas actuales de la familia **Rutaceae**, genero **Citrus**. **A.** Aparato estomático, se observa el ostiolo (Os), las células guarda (Cg), y dos células adyacentes (Ca) con su eje paralelo a lo largo del eje longitudinal de las células guarda, **B.** Esquema de aparato, ostiolo (Os), células guarda (Cg) y células adyacentes (Ca), este tipo de aparato estomático correspondería morfológicamente al de tipo paracítico.

## IX. DISCUSIÓN.

A lo largo de esta investigación se ha visto que las técnicas de extracción de cutículas fósiles están lejos de poder ser aplicadas de manera general ya que cada localidad fósil es particular, el material fósil y los procesos de fosilización le confieren características propias que se verán reflejadas en el tratamiento de extracción del material fósil.

Las técnicas modificadas en este trabajo tienen tres pasos fundamentales, la eliminación del carbón de la hoja fósil, la separación de la cutícula fósil de la roca portadora, y la eliminación de sedimentos de la cutícula fósil libre. Las modificaciones realizadas a las técnicas fueron con base en la naturaleza del material fósil y optimizando el proceso de extracción. Es importante conocer la naturaleza y conformación de nuestra roca portadora, ya que permitirá saber con qué reactivos se debe trabajar, y al contrario de lo que la mayoría de la bibliografía mencionan referente a las técnicas extracción de cutículas fósiles, Upchurch (1995) y Kerp (1991), donde se sugiere la desintegración de la roca portadora al inicio de la técnica para lograr la separación de la cutícula, los procedimientos aquí ensayados procuran mantener a la hoja fósil lo más completa posible durante mayor tiempo ya que permite extraer un área mayor de la cutícula. La desintegración de la roca portadora al inicio de la técnica no es lo más recomendable ya que el fósil se fracciona e incluso se llega a desintegrar.

Comparando las diversas técnicas que recomiendan el uso de HCl o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la limpieza, eliminación de la roca portadora y extracción de cutículas fósiles, se hicieron adaptaciones de las mismas acorde a las características de las muestras fósiles de cada localidad. En el caso de la localidad de Ixtapa, el material fósil está inmerso en una roca conformada de una matriz de limolita y escasos carbonatos que reacciona de manera violenta con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta pulverizarse por completo, sin dejar rastro de la hoja fósil. En contacto con HCl la roca queda altamente fraccionada al igual que la hoja fósil; sin embargo, ninguno de estos reactivos es contundente en la eliminación del carbón de la hoja fósil.

Se aplicaron modificaciones a las técnicas de Schultze (Upchurch, 1995) y HNO<sub>3</sub> (Kerp, 1991), logrando la extracción y limpieza de las cutículas fósiles, optimizando y adicionando reactivos que brindaron mejores resultados. En el caso de las

modificaciones a la técnica de Schultze (1995) se implementó el uso de películas de acetato de celulosa (Lámina 3) que se aplicaron directamente en la hoja fósil limpia de carbón, que permitieron el desprendimiento de la cutícula; sin embargo, los fragmentos son muy pequeños y con remanentes de sedimentos (Lámina 4). La técnica modificada de HNO<sub>3</sub> en comparación con la técnica modificada de Schultze resulta más eficiente destacando que los fragmentos de la cutícula fósil desprendidos son mucho mayores y la eliminación de sedimentos de los mismos es absoluta (Lámina 7). Aunado a esto se debe recalcar que el número de pasos y reactivos son menores lo que se refleja en términos de costo-beneficio. A continuación contrastamos ambas técnicas utilizando importantes parámetros de evaluación (Tabla 3).

**Tabla 3.** Evaluación comparativa de las dos técnicas de extracción de cutículas fósiles aplicadas en el material de la localidad Miocénica de Ixtapa, Chiapas.

<i>Evaluación/ Técnica</i>	<i>Schultze</i>	<i>HNO<sub>3</sub></i>
Fragmentación de la roca	Poco	Mínimo
Eliminación de carbón	Total	Total
Patrones de venación.	Evidentes	Evidentes
Extracción de cutícula	Menor	Mayor
Limpieza de la cutícula	Menor	Total
Tamaño de los fragmentos	Pequeños	Medianos-grandes
Tiempo requerido	Menor	Mayor

Tanto la solución de Schultze como el NHO<sub>3</sub> son excelentes reactivos para la eliminación del carbón de la hoja fósil, produciendo una reacción de reducción del carbón a ácidos húmicos. El carbón presente en el fósil es materia orgánica que consiste en moléculas que se producen a partir de la transformación biológica de células muertas y se asocian en estructuras supramoleculares, que pueden separarse en sus componentes de menor tamaño por fraccionamiento químico (Stevenson, 1982), es decir, precipitan de tal forma que el carbón queda disuelto en el medio ácido. Esta

reacción de precipitación limpia la hoja fósil, fragmentando ligeramente la roca, manteniendo estable el tamaño y la forma de la hoja fósil por lo que se pueden observar patrones de venación, haciendo posible la identificación de estos y de distintos ordenes como primer, segundo y hasta cuarto orden, aunque también son visibles las vénulas, dientes del margen, tricomas y bases de tricomas, glándulas y adicionalmente los patrones celulares de la epidermis en la cutícula fósil extraída. Aunado a esto, el uso del microscopio estereoscopio con luz UV es una herramienta que nos permite ver textura y relieve de las hojas fósiles limpias de carbón (Lámina 2), dando una mejor resolución y realce, razón por la cual la suma de los caracteres foliares y la morfología de la cuticular, son herramientas que nos permitirá realizar diagnosis taxonómicas.

Uno de los objetivos primordiales de extraer la cutícula es porque en ella se ve reflejada la composición estomática de la hoja, herramienta taxonómica que aporta valiosa información para la identificación de plantas actuales y fósiles, a un nivel taxonómico general ya que la identificación genérica y aun más específica requiere de la suma de elementos morfológicos y aun ontológicos de la planta para dicha asignación. Así, la localización de los aparatos estomáticos en la cutícula fósil es variable, debido a que en muchos grupos taxonómicos, los estomas se encuentran en la parte abaxial de la hoja. El proceso de fosilización y la posición de la hoja al fosilizar serán factores fundamentales para facilitar la observación de aparatos estomáticos en las cutículas fósiles.

De la localidad de Ixtapa se obtuvieron 120 preparaciones de las diferentes cutículas que se lograron extraer de diversas hojas fósiles, siendo visibles la impresión de células epidérmicas y los aparatos estomáticos. Una de las principales aportaciones del trabajo, al extraer la cutícula, es que se logró la identificación de dos tipos de aparatos estomáticos de dos distintas cutículas de angiospermas fósiles, que corresponden al tipo anomocítico (Lámina 13), donde cinco o más células encierran las células oclusivas, las células adyacentes no se diferencian de las células epidérmicas, y ciclocítico (Lámina 14), donde un anillo de cinco o más células adyacentes engloban las células guarda (Metcalf y Chalk, 1950).

La extracción de cutículas de plantas actuales permitió analizar la concordancia de estas con las fósiles a través del tipo de aparato estomático. Se encontró relación en la

morfología del aparato estomático de tipo ciclocítico de la cutícula fósil y el aparato estomático de tipo ciclocítico de la cutícula de plantas actuales de la familia Moraceae, de acuerdo con Cabrera (et. al, 2009), esta relación confirma la identificación del registro fósil de acuerdo a Peralta-Medina (2009) y Hernández-Villalva (2011 com. pers). La familia Moraceae es originaria de las regiones tropicales y subtropicales, por lo que su presencia en la localidad Miocénica de Ixtapa, da indicios del ambiente que se desarrolló en la zona.

Por otra parte el tratamiento del material de la localidad cretácica El Chango corresponde a hojas fósiles de gimnospermas en rocas de naturaleza caliza, razón por la cual los reactivos de naturaleza ácida reaccionan violentamente produciendo la desintegración de la roca portadora y la liberación de la hoja fósil, sin embargo, debilita y fragmenta la cutícula fósil. De acuerdo a la naturaleza de la roca portadora se recomienda el uso de la solución de Schultze, de acuerdo con la técnica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de (Accour, 2009), para la eliminación del carbón que cubre la hoja fósil, disolviendo por completo la roca matriz, sin embargo, la hoja fósil queda altamente fragmentada, haciendo imposible su manipulación. Por lo que las modificaciones realizadas a la técnica excluyen la solución de Schultze, adicionando el uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 50%, en relación a lo citado por la autora que indica H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, lo que dio como resultado la preservación intacta la roca matriz, haciendo posible socavar las hojas fósiles, además de ayudar a la eliminación del carbón de la cutícula. La eliminación del resto del carbón adherido a las cutículas fósiles de las hojas de gimnospermas se logra a través del tratamiento con NaOH, reactivo que juega un papel fundamental en el desarrollo de las técnicas aplicadas a la extracción de cutículas fósiles ya que neutraliza las reacciones del HNO<sub>3</sub>, elimina el sobrante de carbón adherido a las cutículas extraídas y sirve como medio de conservación de los fragmentos de cutícula.

Un punto que hay que considerar en la extracción de cutículas fósiles es el proceso de fosilización de los órganos de la planta, entre otros factores, por ejemplo, la filotaxia de las hojas de gimnospermas les confieren características únicas en su arreglo espacial, razón por la cual durante el proceso de fosilización no se encuentran en un solo plano, a diferencia de las hojas de angiospermas que se encuentran en la parte adaxial o abaxial. Esto hace que la extracción de la cutícula fósil de gimnospermas requiera un cuidado especial al disectar y separar la cutícula conservada de la roca portadora, y

aun mayor cautela durante el proceso de tinción y montaje, por lo que es recomendable separar las hojas entre sí.

Los aparatos estomáticos identificados en las cutículas fósiles extraídas de gimnospermas corresponden morfológicamente al tipo ciclocítico (Lamina 15) de acuerdo con Metcalfe y Chalk (1985), conformado por un anillo de 5 o más células que engloban las células guarda. De acuerdo con Barrón y Dieguez (2001), quienes exponen que el aparato estomático ciclosítico es característico, dentro de las gimnospermas, de la familia de las Cupressaceae, por lo que la identificación del aparato estomático corresponde a la asignación morfológica de las hojas fósiles de gimnospermas realizadas por González (2012 com. pers.) que las clasifica en la familia de las Cupressaceae, siendo el aparato estomático un importante carácter diagnóstico para la identificación taxonómica entre las gimnospermas.

De tal forma que el uso de cutículas fósiles y actuales son una herramienta muy importante para la identificación taxonómica, recordando que el nivel taxonómico es a nivel familia e inclusive género ya que es la suma de los elementos morfológicos los que permiten las asignaciones taxonómicas, además de arrojar información sobre las condiciones ambientales a razón de la morfología, distribución y densidad de los aparatos estomáticos.

## **X. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.**

La historia de la Tierra ha quedado escrita en los fósiles, documentos biológicos e históricos que aportan evidencia sobre dicha historia. Existen numerosos registros en los cascos polares, en los fondos marinos y los sedimentos continentales, que muestran que el ambiente no ha sido constante a lo largo del tiempo. Los restos vegetales que se encuentran en estos archivos naturales, manifiestan como la vegetación ha ido variando su composición y distribución a lo largo del tiempo, muestra de estos registros son las cutículas fósiles que se analizaron en esta investigación.

El presente trabajo muestra el alto potencial e importancia de la información a partir del estudio de las cutículas fósiles y actuales, que solo será posible gracias al desarrollo de técnicas y herramientas que nos permitan explotar e interpretar la información contenida en el material fósil, brindando un conjunto de caracteres morfológicos para la asignación taxonómica y el estudio de los aparatos estomáticos para las reconstrucciones paleoambientales.

En última instancia, el grado de estudios paleobotánicos de cutículas fósiles estará determinado por la facilidad del manejo de las técnicas y adecuación de las mismas. El limitado número de estudios realizados hasta la fecha indican que el mayor potencial de las cutículas fósiles corresponde a las identificaciones taxonómicas.

Una de las principales aportaciones de este trabajo es ser el primer registro de extracción de cutículas fósiles de angiospermas en México, por medio del desarrollo, modificación y adecuación de las técnicas a las características del material fósil de las diferentes localidades. Se aportan herramientas que permitirán realizar una reconstrucción paleoambiental más completa en la localidad miocénica de Ixtapa, así como diagnósticos específicos a partir de análisis de la morfología cuticular en el registro fósil de gimnospermas de la localidad del Chango, Chiapas en futuros proyectos.

## XI. LITERATURA CONSULTADA.

- ALVARÉZ, R. 1982. **Presencia de Sagenopteris en facies de la provincial de Burgos. Estudio fitodermatológico.** Cuadernos Geología Iberica, Madrid. Vol. 8, pp. 187-194.
- ALVARADO-ORTEGA., OVALLES-DAMIÁN, y BLANCO-PIÑÓN. 2009. **The fossil fishes from the Sierra Madre Formation, Ocozocoautla, Chiapas, Southern Mexico.** Paleontologia electronica, Vol. 12, pp. 4-22.
- AUCOUR, ANNE-MARIE, 2009. **Insights into preservation of fossil plant cuticles using thermally assisted hydrolysis methylation.** Organic Geochemistry, Vol. 40, pp. 784-794.
- ARCHANGELSKY, S. 1974. **Sobre la utilización de Microscopio Electrónico de Barrido en el estudio de hojas fósiles del Cretácico Inferior de Patagonia, Argentina.** Boletín de la Sociedad Botánica de México, Vol. 33, pp.1-12.
- ARCHANGELSKY, S y A.B, ZAMUNER. 1991. **Estudios cuticulares en Cycadopsidas fosiles. El género Kurtzia Frenguelli, 1942.**Buenos Aires. *Ameghiniana*Vol. 28, pp. 365-374.
- BANDULSKA, H. 1924. **On the cuticle of some fossil and recent Fagaceae.** Botanical Journal of the Linnean Society, Vol. 46, pp. 427-441.
- BANDULSKA, H. 1926. **On the cuticle of some fossil and recent Lauraceae.** Botanical Journal of the Linnean Society, Vol. 47, pp. 383-425.
- BARANOVA, M. 1972. **Systematic anatomy of the leaf epidermis in the magnoliaceae and some related families.** Vol 24, pp. 447-469.
- BARANOVA, M. 1987. **Historical development of the present classification of morphological types of stomates.** The Botanical Review, Vol. 53, pp. 53-79.
- BARCLAY, R., MCELWAIN, J. DILCHER, D. y SAGEMAN, B., 2007. **The cuticle database: Developing an interactive tool for taxonomic and paleoenvironmental study of the fossil cuticle record.**Cour. Forsch-Inst Senckenberg, Vol. 258, pp. 39-55.
- BARRON, E., DIEGUEZ,C .2001.**Estudio macroflorístico del Mioceno Inferior lacustre de la Cuenca de Rubielos de Mora (Teruel, España).** Boletín Geológico y Minero, Vol. 112, pp. 13-56.

- BOLD, H., C., ALEXOPOLUS, T., DELEVORYAS. 1987. **Morphology of plants and fungi**. Harpercollins College Div, USA, 912pp.
- BORNEMANN, J.G. 1856. **De los residuos orgánicos del grupo de carbón de los letonesen Turingia, contribución a la floray la fauna deesta formación, especialmente en las cícadas fósiles**. En Deutschen Geologischen Gesellschaft, Vol. 25, pp. 367-373.
- BRODIE, P.B. 1842. **Notice on the occurrence of plant in the plastic clay of the Hampshire coast**. Geological Society of London, Vol. 3, pp.592-594.
- BRONGNIART, A. 1834. **Historia de la vegetación fósil**. Paris, 488 pp.
- BUKOVAC, M.J., RASMUSSEN, H.P., SHULL, V.E.1981. **The cuticle: surface, structure and function**. Scanning electron microscopy, Vol. 3, pp. 213-223.
- CARPENTER, K. J. 2005. **Stomatal architecture and evolution in basal angiosperms**. American Journal of Botany, Vol. 92, pp. 1595-1615.
- CABRERA, C.; GELSI, G., ALBORNOZ, P. y ARIAS, M. 2009. **Anatomía foliar de Ficus maroma (Moraceae) y análisis de hojas expuestas a la polución atmosférica en la provincia de Tucumán (Argentina)**. Lilloa Vol. 46, pp. 34-42.
- DILCHER, D.L. 1974. **Approaches to the identification of angiosperm leaf remains**. TheBotanicalReview, Vol. 40, pp.1-157.
- ESAU, K. 1977. **Anatomy of seed plants**. The New York botanical, USA. pp. 555.
- ESAU, K. 1987. **Plant anatomy**. Wiley-Interscience, USA 521pp.
- FERRUSQUÍA V.I. 1965, **Geología del Área Ixtapa-San Cristóbal de las Casas, Chiapas**. Informe Geológico, Vol. 507.
- FERRUSQUÍA V.I. 1996. **Contribución al conocimiento geológico de Chiapas, El Área Ixtapa-Soyaló**. Boletín 109 del Instituto de Geología, UNAM. México.
- FLORIN, R. 1951. **Evolution in cordaites and conifers**. ActaHortiBergiani, Vol. 15, pp. 285–388.
- FLORIN, R. y BOUTELJE, J.B. 1954. **External morphology and epidermal structure of leaves in the genus Libocedrus, s.lat**. ActaHortiBergiani, Vol. 17, pp. 7-37.
- GATES, D. M. 1980. **Biophysical ecology**. Springer-Verlag, New York. 611 pp.

- GRAHAM, L. 1993. **Origin of land plants**. USA. 287pp.
- GONZALEZ, I., Calvillo-Canadell, L., Silva, A., Cevallos-Ferriz, S.R.S. 2011. **Coníferas (Araucariaceae y Cupressaceae) del Cretácico (Aptiano-Campaniano) de Chiapas**. Libro de resúmenes, XII Congreso de Paleontología, México, 68 pp.
- HARRIS, T.M. 1926. **Note on a new method for the investigation of fossil plants**. New Phytologist, Vol. 25, pp.58-60.
- HEUER, R. E., 1965. **Geology of the Soyalo-Ixtapa Area, Chiapas, Mexico**. University of Illinois at Urbana, M. Sc.Thesis, 146 pp
- JEFFREE, C. 2006 **The fine structure of the plant cuticle**. Biology of the plant cuticle. Blackwell, Alemania 446pp.
- KERP, H. 1991. **The study of fossil gymnosperms by means of cuticularanálisis**.Departament of Geology. University of Pensylvania, Philadelphia. U.S.A. pp. 548-559
- LALLANA, M., BILLARD, C., ELIZALDE, J. y LALLANA, V. 2006. **Breve revisión sobre características de la cutícula vegetal y penetración de herbicidas**. Ciencia, docencia y tecnología. Vol.33, pp. 95-112.
- METCALFE, C. R., y L. CHALK. 1985. **Anatomy of the dicotyledons**. Clarendon Press, Oxford, UK. 450 pp.
- MIRANDA, F. 1963. **Two plants from the amber of the Simojovel, Chiapas, Mexico, area**. Journal of Paleontology Vol. 37, pp. 611-614.
- MOÈSLE, B., COLLINSON, M.,FINCH, P., STANKIEWICZ, A., SCOTT, A. y WILSON, R. 1998. **Factors influencing the preservation of plant cuticles: a comparison of morphology and chemical composition of modern and fossil examples**. Bol. Soc. Argent.Bot. Vol.16, pp.1-26.
- PERALTA-MEDINA, E. 2009. **Arquitectura foliar de hojas fósiles de Ixtapa, Chiapas, México**. Tesis en Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. UNAM, México, 77pp.
- PRIESTLEY, J.H. 1943. **The cuticle in angiosperms**. The botanical review University of Leeds, England.Vol. 9, pp. 34-46.
- RZEDOWSKI, J. 1988. **La Vegetación de México**. Limusa, México. 397pp.
- SANDOVAL, E. 2005. **Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal**. Cuadernos del Instituto de Biología 38, UNAM, México. 277pp.

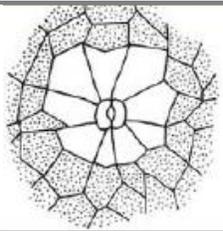
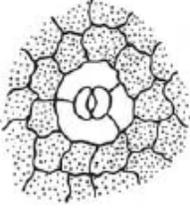
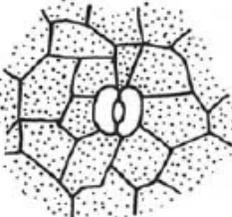
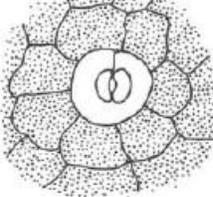
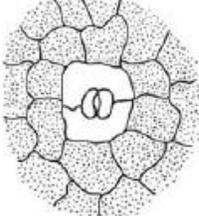
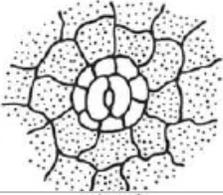
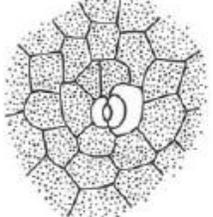
- SIMPSON, M. 2010. **Plant systematics**. Academic press, USA, 739pp.
- STEWART, W. y ROTHWELL, G. 1993, **Paleobotany and the evolution of plants**. USA, 521 pp.
- STEVENSON, F. 1982. **Humus chemistry: Genesis, Composition and reactions**. Wiley, New York, USA, pp. 118-131.
- STOCKEY, R.A. y I.J, ATKINSON. 1993. **Cuticle micromorphology of Agathis Salisbury**. **International Journal of Plant Sciences**, Vol. 154, pp.187-225.
- TAYLOR, T y TAYLOR, E. 1993. **The biology and evolution of fossil plants**. USA, 981pp.
- TAYLOR, T.N., TAYLOR, E.L. y KRINGS, M. 2009.**Paleobotany: The Biology and Evolution of Fossil Plants**. 2nd Ed.Prentice-Hall, 1230pp.
- THOMAS. B. y SPICER, R. 1986. **The evolution and paleobiology of land plants**. USA 309pp.
- UPCHURCH, G. R. 1984. **Cuticle evolution in Early Cretaceous angiosperms from the Potomac Group of Virginia and Maryland**. **Annals of the Missouri Botanic Garden** Vol. 71, pp. 522–550.
- UPCHURCH, G. R. 1995. **Dispersed angiosperm cuticles: their history, preparation, and application to the rise of angiosperms in Cretaceous and Paleocene coals. Southern western interior of North America**. **International Journal of Coal Geology** Vol. 28, pp. 161–227.
- VEGA, F.J., ALVAREZ, F., AND CARBOT-CHANONA, G. 2007.**Albian penaeoidea (Decapoda: Dendrobranchiata) from Chiapas, Southern Mexico**. En 3rd Symposium on Mesozoic and Cenozoic Decapoda Crustaceans, Museo di Storia Naturale di Milano: Memorie della Società Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale di Milano, Vol. 35, pp. 6-8.
- WEBER, R. 2006. **Cretácico de Coahuila**. Instituto de Geología, UNAM. México 126 pp.
- WOLFE, J.A., and UPCHURCH, G.R., JR., 1986, **Vegetation, climatic and floral changes at the Cretaceous-Tertiary boundary**. **Nature** Vol. 324, pp. 148-152.

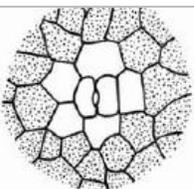
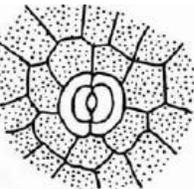
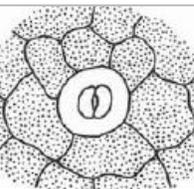
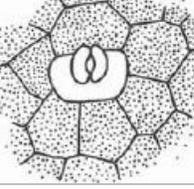
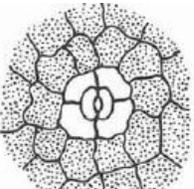
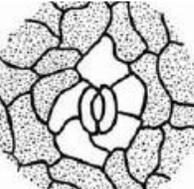
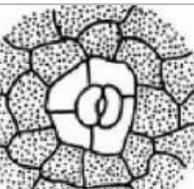
**Páginas en Internet consultadas**

- Desarrollo municipal del Estado de Chiapas: <http://www.e-local.gob.mx>
- Municipio de Ixtapa: [www.ixtapa.chiapas.gob.mx](http://www.ixtapa.chiapas.gob.mx)
- Universidad Politécnica de Valencia: [www.euita.upv.es](http://www.euita.upv.es)

## Anexo 1

**Tabla 3.** Clasificación de la morfología de los aparatos estomáticos según el número y disposición de células guarda (Tomado y modificado de Barclay et al, 2007)

Actinocítico		Un solo anillo de 5 o más células alargadas que encierran las células guarda
Anisocítico		3 células, que pueden ser desiguales en tamaño encierran las células guarda
Anomocítico		5 o más células encierran las células oclusivas, las células adyacentes no se diferencian de las células epidérmicas
Desmocítico		1 sola célula encierra las células guarda, con una pared anticlinal que se extiende desde uno de los polos
Diacítico		2 células encierran las células guarda en ángulo recto con el eje longitudinal de las células guarda
Ciclocítico		Un anillo de 5 o más células que engloban las células guarda.
Hemiparacítico		1 de las células adyacentes es paralela al eje longitudinal de las células guarda, la otra célula guarda tiene tres o más células epidérmicas que la rodean

Laterocitico		El estoma se encuentra flanqueado por 3 o más células subsidiarias
Paracitico		1 ó 2 células adyacentes a las células de guarda con su eje paralelo al largo del eje longitudinal de las células guarda
Pericitico		Una sola célula adyacente engloba a las dos células guarda
Polocitico		Una célula adyacente incompleta envuelve a las células guarda.
Saurocitico		4 células, más o menos de igual tamaño, con las paredes anticlinales de las células subsidiarias que se extiende en ángulo recto en los polos y a la mitad de las células guarda.
Estefanoicitico		Estoma rodeado por 4 o más células subsidiarias ligeramente diferenciadas formando más o menos una roseta
Tetracitico		Cuatro células adyacentes engloban las células guarda.

Anexo 2

