



Sección de Biología
Universidad de La Laguna

Ecofisiología de las violetas del Teide

Ecophysiology of the violets from Teide



Trabajo de Fin de Grado

Celine I. García Rodríguez

Tutorizado por Beatriz Fernández Marín

Grado en Biología. Junio 2022

Agradecimientos

La verdad es que no sé ni por dónde empezar, pero bueno, poco a poco. Quien me conozca un poco se sorprenderá del cambio de equipo “animales” a equipo “plantas”.

La primera persona a la que le debo agradecer haber empezado (y terminado) este trabajo ha sido Beatriz, mi tutora, que fue quien me propuso el tema y gracias a su capacidad para la organización y perseverancia (y esfuerzo) ha sido posible que hoy esté redactado. A ver si se me pega algo. También fueron sus clases y su entusiasmo los que me animaron a comenzar a colaborar en el departamento de Ecofisiología. Allí he conocido a mucha gente, cada vez más con las nuevas incorporaciones. Gracias a todos ellos, que me han acompañado desde el principio y me han inculcado esos conocimientos ecofisiológicos (y culinarios) de los que carecía. A Pável, quien me acogió desde el primer momento y cuyo trabajo ha sido un ejemplo para mí, y Yauci, mi compañero de LMA y tertulias. Y Alicia.... Ay, no sé qué hubiese hecho sin esta personita, que me ha ayudado con todo lo que he necesitado, apoyado en los momentos más bajos y que me ha dado perspectiva para discutir muchos de los resultados.

También quiero agradecer al Cabildo de Tenerife los permisos otorgados para trabajar con estas especies protegidas y a todos los técnicos del Parque Nacional del Teide que me han proporcionado no solo las semillas y plantas del propio invernadero sino información sobre la evolución de la planta salvaje *in situ*. En especial a Manolo, que nos acompañó en la que fue la primera medida de *Viola guaxarensis* de la historia.

A todas las personas que han estado a mi lado estos años en el grado, y en mi vida.

Por último, quería agradecerle a mi madre no solo que haya terminado el grado, sino haberme dado la oportunidad de tener todo lo que tengo y de estar donde estoy. Que ha estado siempre en cada momento de mi vida y me ha aguantado incluso cuando yo no lo hacía. Que me ha ayudado a conseguir todas mis metas. A su infinito apoyo y dedicación.

Y el michi, no nos olvidemos del michi.

Índice

Resumen	3
Abstract.....	3
Introducción.....	4
2.1 Ecofisiología alpina y el caso del Teide.....	4
2.2 Género <i>Viola</i>.....	6
3.Objetivos.....	8
4. Material y Métodos.....	9
4.1. Zona de estudio y material vegetal	9
4.2. Determinación de las propiedades hídricas del suelo	9
4.3. Medidas de dimensiones y peso de las semillas.....	10
4.4. Test de germinación	10
4.5. Cuantificación de la densidad vascular y estomática en hojas	11
4.6. Curvas de luz de fotosíntesis	11
4.7. Medidas de las propiedades ópticas de las hojas.....	13
4.8. Determinación de la masa foliar por área.....	14
4.9. Análisis estadístico	14
5. Resultados.....	14
5.1. Propiedades hídricas del suelo.	15
5.2. Propiedades de las semillas	16
5.3. Densidad vascular y estomática	17
5.4. Curvas de luz.....	18
5.5. Propiedades ópticas.....	20
5.6. Masa foliar por área	21
6. Discusión	21
6.1 Propiedades hídricas del suelo	22
6.2 Propiedades de las semillas y germinación.....	23
6.3 Características foliares	23
6.4 Propiedades ópticas	25
Conclusiones.....	26
Conclusions.....	27
Bibliografía	27

Resumen

La violeta del Teide (*Viola cheiranthifolia*) es una de las especies endémicas más emblemáticas de Tenerife y la que florece a mayor altitud de España. No es hasta 2020 cuando se descubre que una de las poblaciones más aisladas de Alto Guajara está formada por otra “nueva” especie a la que llamaron *Viola guaxarensis*. Pese a su importancia para una correcta gestión de las especies, la ecofisiología de ambas hasta la fecha era totalmente desconocida. En este trabajo se ha realizado un completo estudio ecofisiológico comparando ambas especies de *Viola* presentes en el Parque Nacional del Teide. El estudio ha incluido la caracterización del suelo y las semillas así como de las propiedades de venación, fotosintéticas, ópticas y estructurales de las hojas en una localidad por especie. *V. guaxarensis* mostró mejores porcentajes de germinación en sus semillas, mayor tasa de asimilación neta de carbono y mayor contenido de flavonoides y clorofilas en sus hojas. La población de *V. cheiranthifolia* estudiada habita en un suelo con menor capacidad de retención hídrica, posee mayor masa foliar por área y valores superiores en absorptividad y antocianinas. Este estudio aporta por primera vez datos ecofisiológicos sobre ambas especies y apunta ligeras pero constatables diferencias.

Palabras clave: *Viola cheiranthifolia*, *V. guaxarensis*, Islas Canarias, endémico, alta montaña

Abstract

Teide violet (*V. cheiranthifolia*) is one of the most emblematic endemic species of Tenerife and the one which blooms at highest altitude in Spain. It is not until 2020 when it was discovered that one of the most isolated populations of Alto Guajara was formed by other “new” specie which was called *Viola guaxarensis*. Despite its importance for a correct management of the species, the ecophysiology of both was totally unknown. In this work a complete ecophysiological study has been done comparing both *Viola* species present in Teide National Park. This has included soil and seed characterization and venation, photosynthetic, optical and structural properties of leaves of one localization per specie. *V. guaxarensis* shows better percent of seed germination, more net carbon assimilation rate and flavonoids and chlorophylls content. The studied *V. cheiranthifolia* population inhabits in a soil with less hydric retention capacity, has more leaf mass per area and higher values in

absorptivity and anthocyanins. This study apports for the first-time ecophysiology data of both species and shows small but remarkable differences.

Key words: *Viola cheiranthifolia*, *V. guaxarensis*, Canary Island, endemic, high mountain

Introducción

2.1 Ecofisiología alpina y el caso del Teide

Las plantas son organismos sésiles que deben adaptar sus procesos fisiológicos a factores abióticos entre los que destacan la temperatura, disponibilidad de agua, nutrientes y CO₂. (Fernández-Marín et al., 2020).

Los ecosistemas alpinos se consideran hábitats extremos ya que sus duras condiciones ambientales hacen que se encuentren sometidas a estrés (o estreses, es decir, fuera de su rango óptimo fisiológico), limitando procesos fundamentales como el crecimiento, asimilación de carbono, reproducción y fitness (adaptación exitosa al ambiente) (Fernández-Marín et al., 2020).

Los ecosistemas alpinos se sitúan por encima del *treeline* máximo (Körner, 2021) y se caracterizan por las bajas temperaturas, suelos pobres, condiciones hídricas desafiantes y temporadas de crecimiento cortas que limitan la reproducción, supervivencia y desarrollo de la mayoría de plantas alpinas (Chen et al., 2021). De hecho, uno de los mayores retos es el reclutamiento, el cual está determinado por la disponibilidad, calidad y dispersión de los propágulos, así como la germinación y establecimiento de las semillas (Chen et al., 2021). Posteriormente, una vez el individuo ha empezado a desarrollarse, es la capacidad fotosintética la que influye en su crecimiento y está relacionada tanto directa como indirectamente con las condiciones climáticas por lo que, si estas son desfavorables, pueden contribuir a la disminución de la fotosíntesis (Dey et al., 2022). El frío, por ejemplo, es uno de los principales estreses que afectan al fotosistema II (PSII) provocando una disminución en la eficiencia fotosintética máxima (Fv/Fm) y se ha demostrado que está relacionado con la baja disponibilidad de CO₂ y en la limitación de la fotosíntesis al inhibir enzimas clave en la biosíntesis de sacarosa y almidón (Fu et al., 2016). La luz es también uno de los factores QUE más influyen en las plantas, modulando su morfología y fisiología. Para tolerar su exceso e

impedir la fotoinhibición e inactivación del PSII presentan principalmente adaptaciones fotoprotectoras que evitan la absorción de luz (Perera-Castro et al., 2017).

La sequía por sí misma no es uno de los elementos más negativos en ambientes alpinos localizados en latitudes medias, que desde el punto de vista preliminar ecofisiológico, han sido los más estudiados hasta el momento (Körner, 2021). La limitación hídrica, sin embargo, es un factor muy relevante en montañas con estacionalidad seca (Calanca, 2007; Chen et al., 2020; Xu et al., 2021) y, en conjunción con otros como altas temperaturas e irradiancia, puede crear situaciones catastróficas (González-Rodríguez et al., 2021).

Una de las adaptaciones físicas es la disminución de la densidad estomática con la altitud debido, además de los estreses anteriormente nombrados, a la variación en la presión parcial del CO₂. La difusión de este gas está inversamente correlacionada con el alto flujo de salida de vapor de H₂O, el cual es superior a medida que aumentamos la elevación (Zhang et al., 2020). Las responsables de distribuir el agua al mesófilo y los estomas son las venas menores (Kawai & Okada, 2016) por lo que tienen gran influencia en la fotosíntesis y la resistencia a la sequía. A mayor déficit hídrico y alta irradiancia, mayor densidad vascular (VLA) que a su vez está relacionado con conductos estrechos y densos y paredes más gruesas, lo que deriva en una mayor masa foliar por área (Wang et al., 2020).

Las características del suelo tienen gran influencia sobre la vegetación ya que de ello depende la capacidad de obtener el agua disponible en él. Una de las principales variables que determinan la retención de agua en el suelo es la porosidad y la distribución del tamaño de los poros, es decir, la textura, la densidad de los elementos y la estructura secundaria (Mecke et al., 2002) así como la presencia de aluminosilicatos no cristalinos (La Manna et al., 2018). La capacidad de retención de agua disponible para las plantas (CRAD) es aquella que se encuentra almacenada entre la capacidad de campo y el punto de marchitamiento permanente el cual varía según la planta y factores ambientales (Porta Casanellas et al., 2003).

Sobrevivir en estas condiciones supone un reto para las especies, por lo que aquellas que lo consiguen adquieren un gran valor, sobre todo porque sólo se encuentran en lugares muy limitados. La biota presenta gran endemidad y adaptabilidad (Steinbauer et al., 2016). Se considera que una de las principales amenazas es el cambio climático (Irl et al., 2015), sin

embargo, los últimos 20-30 años, los ecosistemas alpinos han sido gravemente alterados por actividades antrópicas: usos como combustible, aumento de cultivos, sobrepastoreo, turismo de aventuras, senderismo, contaminación de agua y suelos... (Byers, 2014)

La mayoría de investigaciones llevadas a cabo en zonas subtropicales son en los Andes argentinos, bolívares y chilenos; en el este y sur del Himalaya y el archipiélago de Hawái (Körner, 2021). El archipiélago de Canarias se sitúa en el océano Atlántico y está formado por ocho islas volcánicas, de las cuales Tenerife se considera la décima más alta a nivel mundial. Los espacios insulares son mucho más frágiles a nivel ambiental, económico y social (López Díez et al., 2016) y algunos de los riesgos que afrontan estos ecosistemas son la desaparición de especies, la introducción de otras invasoras (Alexander et al., 2016; Lembrechts et al., 2016), el riesgo de deriva genética o antropización. Concretamente, los alpinos situados en islas oceánicas pueden considerarse los más raros, limitados y vulnerables (Rodríguez-Rodríguez et al., 2019). En Canarias se ubican a partir de 2900-3100 m por lo que solamente incluiría a las islas de Tenerife y la Palma.

En la isla de Tenerife, el Parque Nacional del Teide, con una altitud máxima de 3718 metros, posee una historia biogeográfica compleja debida a episodios de colonización, vulcanismo, hundimientos, deslizamientos, complejidad topográfica y escasa diversidad (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). En este ecosistema alpino, las precipitaciones son escasas (<350 mm anuales) y las temperaturas registradas son menores a 0° durante el invierno y más de 25°C en verano siendo mucho más amplio el rango a ras del suelo (-10°C hasta 50°C) (Martín-Esquivel & Pérez González, 2019). El Parque Nacional cuenta con un 32% de endemismos de 168 especies alpinas (Acebes et al., 2009). A pesar de ello, la información ecofisiológica disponible sobre ellas es muy limitada incluso en especies emblemáticas como *Viola cheiranthifolia* y *V. guaxarensis*.

2.2 Género *Viola*

Viola L. es un género de la familia *Violaceae* que habita en regiones no cubiertas por hielo incluyendo montañas e islas tropicales y subtropicales y que cuenta con 583-620 especies (Yockteng et al., 2003). En concreto, *Viola* sect. *Melanium* Ging contiene 125 especies distribuidas principalmente por Europa y oeste de Asia (Marcussen et al., 2015; Yockteng et al., 2003). En Canarias, el género *Viola* incluye ocho especies de las cuales seis pertenecen a

esta sección, pero solo la mitad habitan en alta montaña: *V. palmensis* en el Parque Nacional de la Caldera de Taburiente (1800-2400 m); y *V. cheiranthifolia* y *V. guaxarensis*, en el Parque Nacional del Teide.

Viola cheiranthifolia es una planta enana caméfita endémica de Tenerife que se encuentra desde 2200 – 3700 m en Pico Viejo (Seguí, J. et al. 2017). La planta crece en suelos pobres entre los escombros volcánicos, mezclada con piedra pómez en algunas localidades. Esta especie está dentro de la categoría vulnerable en el Catálogo Nacional (BIOTA) y se encuentra principalmente en el interior de la caldera de Las Cañadas y Teide-Pico Viejo. Según el estudio realizado por Slazak et al., (2021), la diversidad de ciclótidos, péptidos cíclicos con propiedades insecticidas, con los que cuenta *V. cheiranthifolia* es la menor frente a otras *Violas* endémicas de la isla seguramente debido al hábitat donde se encuentra. Se observaron diferencias en el patrón de diversificación entre *V. cheiranthifolia* y la población de Guajara (*V. guaxarensis*), lo que concuerda con el estudio poblacional de (Rodríguez-Rodríguez et al., 2019) en el que describe a esta última como una población aislada y antigua. También destaca la importancia de centrarse en el control de la herbívora, repoblaciones y vigilancia en los cambios observados en los nichos. A pesar de las condiciones ambientales y bióticas adversas, se ha demostrado que *V. cheiranthifolia* no muestra una limitación por polen gracias a su alta autofertilización aunque su adaptación se ve comprometida debido a la presencia de conejos (Seguí et al., 2017).



Figura 1 : Foto de ejemplares de A) *Viola cheiranthifolia* y B) *V. guaxarensis* en Montaña Blanca y Alto Guajara respectivamente. Fotos realizadas en el Parque Nacional del Teide mayo 2022

Viola guaxarensis es una de las nuevas especies que se ha descrito en el Parque por Gómez et al., 2020. Cuenta con alrededor de 3000 individuos, principalmente en Montaña Guajara aunque cabe destacar una docena en Topo de la Grieta. En un principio, se creía que pertenecía a *V. cheiranthifolia* y en posteriores análisis genéticos, un híbrido o subespecie de *V. palmensis*. En el mismo estudio de Gómez et al. (2020), se observaron diferencias entre los microclimas de los distintos hábitat: de media, *V. cheiranthifolia* está en lugares más fríos (3.5 – 8.8 °C) mientras que *V. guaxarensis*, unos 11.1°C, de ahí la reducción o ausencia de estructuras morfológicas como el pedúnculo o las estípulas en la primera. Algo similar ocurre entre las especies tinerfeñas con *V. palmensis* que cuenta con hojas y flores superiores ya que allí las precipitaciones en esa isla son superiores (<500 mm/anales) que la capitalina.

Existe solamente un estudio que describe a la nueva especie y apenas unos pocos han evaluado algunos aspectos bioquímicos (Slazak et al., 2021), genéticos (Rodríguez-Rodríguez et al., 2015; Rodríguez-Rodríguez et al., 2019; Yockteng et al., 2003) y ecológicos (Seguí et al., 2017) de *V. cheiranthifolia*. Es necesario comprender las características ecofisiológicas de ambos endemismos. Conocer aspectos funcionales de su biología reproductora, así como de su actividad fotosintética y mecanismos de fotoprotección podrían ser herramientas imprescindibles para una conservación eficiente de sus escasas poblaciones en contexto del cambio climático y degradación de ecosistemas por parte del ser humano.

3.Objetivos

Debido a los escasos conocimientos actuales sobre estos endemismos presentados anteriormente, el objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado es comparar ecofisiológicamente las dos especies de *Viola* – *V. cheiranthifolia* y *V. guaxarensis* – situadas en el Parque Nacional del Teide. Para ello, se establecieron 5 objetivos específicos a desarrollar en dos poblaciones seleccionadas (una por cada especie):

- Evaluar las características hídricas del suelo de cada hábitat con especial hincapié en la capacidad de retención de agua y a su disponibilidad para las plantas a una profundidad alcanzable por las raíces de ambas especies.

- Caracterizar las propiedades de las semillas de ambas especies y sus tasas de germinación en condiciones controladas en laboratorio (de humedad, luz y temperatura).
- Estudiar parámetros relacionados con las ecofisiología foliar del agua como lo son la masa foliar por unidad de área, el patrón de venación y la densidad estomática.
- Evaluar la capacidad fotosintética (asimilación de CO₂) de ambas especies en individuos intactos y en condiciones naturales en campo en un amplio rango de radiación visible.
- Estimar las propiedades ópticas de las hojas relacionadas con la fotoprotección y el aprovechamiento fotosintético de la luz visible.

4. Material y Métodos

4.1. Zona de estudio y material vegetal

El área de estudio comprendió dos localidades dentro del Parque Nacional del Teide: Montaña Blanca (28.2656025, -16.6016952 orientación este a 2.349 metros de altitud) y Alto Guajara (28.2151162; -16.6121023 con orientación sur a 2.700 m), el hábitat donde se encuentran las poblaciones *Viola Cheiranthifolia* Humb. & Bonpl y *Viola guaxarensis* M. Marrero, Docoito Díaz & Martín Esquivel, respectivamente. Se recogieron 8 muestras de suelo cercanas a los individuos en *cores* de 100 cm³ en Julio de 2021 en Montaña Blanca y Abril 2022, Guajara.

Se midió *in situ* con Li-6800F (LI-COR, EEUU) distintos parámetros y se extrajeron algunas hojas de las poblaciones salvajes que se utilizaron para determinar las propiedades estructurales y ópticas.

Para el test de germinación y para la densidad de venación y densidad estomática, el Vivero de El Portillo cedió 100 semillas y 5 ejemplares juveniles de cada especie. En el caso de las semillas, fueron recolectadas por los técnicos del Parque en Alto Guajara, del sendero S6 (*V. guaxarensis*, 14/07/2020) y en Montaña Blanca, S3 (*V. cheiranthifolia*, 07/07/2020).

4.2. Determinación de las propiedades hídricas del suelo

En cada localidad se extrajeron 4 parejas de *cores* de 100 cm³ cerca de algunos individuos a 10-15 cm de profundidad. Uno de ellos se utilizaba para medir el potencial hídrico así como

el contenido hídrico absoluto que existía cuando se recolectó en campo; y con el otro, la capacidad de campo del suelo. En este último experimento, la muestra de suelo se hidrataba artificialmente con agua destilada y se dejaba secar lentamente para poder realizar una curva contenido hídrico vs potencial hídrico.

El potencial hídrico se midió con un psicrómetro de termopar WP4C Dewpoint PotentiaMeter (METER Group, Estados Unidos) en modo preciso y calibrado con 0.5 mol KCl/ Kg H₂O a 25°C. El contenido hídrico absoluto (CH) se estimó como se muestra a continuación:

$$(1) \quad CH = \frac{(Pf - Ps)}{Ps}$$

donde Pf es el peso fresco y Ps, peso seco obtenido tras 24 h en estufa a 105°C.

Se utilizó la balanza MXX-612 (Denver Instrument Company, Estados Unidos) de 10 mg de precisión para los *cores* y balanza analítica AB54-S (METTLER TOLEDO, España) de 0,1 mg de precisión.

4.3. Medidas de dimensiones y peso de las semillas

Para la caracterización físicas de las semillas, se tomaron fotos a escala de 12 semillas y posteriormente se midieron con el software libre de NIH, [Image J](#). Con la balanza analítica AB54-S, se pesaron distintos 6 grupos de 5, 25 y 50 semillas de cada especie. Para obtener un peso por semilla, se dividió el peso promedio del grupo entre el número de semillas y se realizó la media con los otros grupos.

4.4. Test de germinación

En la evaluación del porcentaje de germinación de semillas se realizaron 4 réplicas de 12 semillas por especie. Se colocaron en placas de Petri con sustrato y papel de filtro saturados con agua destilada pero no en exceso, creando un ambiente con humedad máxima. Se situaron en una cámara con fotoperíodo de 12 horas con fluorescentes a 22.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a temperatura constante de 20°C. Se monitorizaron todos los días laborables durante un mes (30 días) y cada semilla se consideraba como germinada cuando su radícula tenía una medida igual o superior a su longitud total.

La caracterización tuvo lugar con las semillas proporcionadas por el vivero El Portillo. Se tomaron fotos con escala a partir de una lupa binocular y se midieron con el [Image J](#).

4.5. Cuantificación de la densidad vascular y estomática en hojas

Para la determinación de las densidades estomática y de venación en las hojas de *V. cheiranthifolia* y *V. guaxarensis*, se siguió la metodología Hickey (1973) y Scoffoni et al. (2011), aunque con algunas modificaciones. Se utilizaron 6 hojas de cada especie procedentes de los juveniles proporcionados por El Portillo.

Se introdujeron las hojas durante 24 horas en 5% NaOH y posteriormente en 3.5 % de hipoclorito sódico (lejía comercial) hasta que blanquearon. Se realizaron deshidrataciones progresivas en etanol: 30%, 50% 70% y 100% (5 minutos en cada una). Posteriormente, se introdujeron las hojas en dos tinciones sucesivas: 10 minutos en 1% safranina en 100% etanol y 30 segundos en 1% fast green en 100% etanol. Finalmente se dejaron 5 minutos en etanol 100 % para retirar el exceso de coloración en el mesófilo y se secaron al aire. Para aumentar la resolución, se realizó una rehidratación en agua destilada durante al menos media hora.

Para la visualización de estomas y venas menores se utilizó un microscopio Panthera U (MOTIC®, China) con cámara Moticom X³. El programa con el que era posible obtener las fotos fue *Motic Image Plus 3.0 ML Software*. Con el [Image J](#) se pudo cuantificar ambas densidades.

Para densidad vascular se tomaron fotos de la hoja al completo para calcular la longitud y área de las venas mayores (1º y 2º) mientras que para las 3º y menores se utilizó el objetivo 4X en un área del semilimbo de la hoja. La fórmula en la que se basaron los cálculos fue:

$$(2) \quad DV = \frac{\text{longitud}_{1-2}}{\text{área foliar}} + \frac{\text{longitud}_{3 \rightarrow}}{\text{área del objetivo}} \quad (\text{mm} \cdot \text{mm}^{-2})$$

Para densidad estomática (DE) se utilizó un objetivo 10X y calculó por la siguiente fórmula:

$$(3) \quad DE = \frac{\text{Nº de estomas}}{\text{área del objetivo}}$$

4.6. Curvas de luz de fotosíntesis

Una curva de luz describe cómo varía la tasa fotosintética en función de la luz.

Los parámetros fotosintéticos provienen de individuos de poblaciones de Alto Guajara y Montaña Blanca. Se midieron con un Analizador de Gases Infrarrojos (IRGA) modelo LI-6800F (LI-COR, EEUU) el cual permitía conocer y regular distintos parámetros como la radiación fotosintéticamente activa (PAR), la humedad y la concentración de CO₂. A partir de ellos se pueden calcular otros tan importantes como la tasa de transporte electrónico (ETR), asimilación neta de carbono (A) o el *quenching* no fotoquímico (NPQ).

Se introdujeron una o dos hojas en la cámara de muestras de la pinza del IRGA. Esta celda se compara con otra cámara de referencia. Se configuró el aparato para que sometiera a las hojas a 406 ppm de CO₂, 20°C y 50% de humedad. Se dejaba el tiempo suficiente como para que las medidas se estabilizaran y se realizaba una curva de luz. Cada par de medidas se indujo un *matching*, un proceso por el cual se compara el ΔCO₂ y ΔH₂O de ambas celdas para minimizar los errores sistemáticos ya que a veces, debido a imperfecciones del propio IRGA, puede haber fugas de CO₂.

La curva constó de 8 puntos de 2 minutos de diferente PAR (μmol fotones m⁻² s⁻¹): 2000; 1200; 600; 300; 100; 50; 25; 0. Se realizan en orden descendente para asegurar que todos los estomas se encontraran abiertos. Posteriormente, se corregía el área foliar con fotos tomadas en la propia pinza con [Image J](#) ya que las hojas no ocupaban el total de las almohadillas de 2 cm².

Siguiendo los modelos matemáticos de (Lobo et al., 2013) para curvas A_N/PAR, en concreto, la ecuación de la asimilación neta de carbono (A_N) basada en el modelo de (Smith, 1936), se emparejaron los datos relativos a la asimilación neta de carbono con el PAR recibido en Excel y se realizó un ajuste polinomial mediante la herramienta del propio programa, Solver.

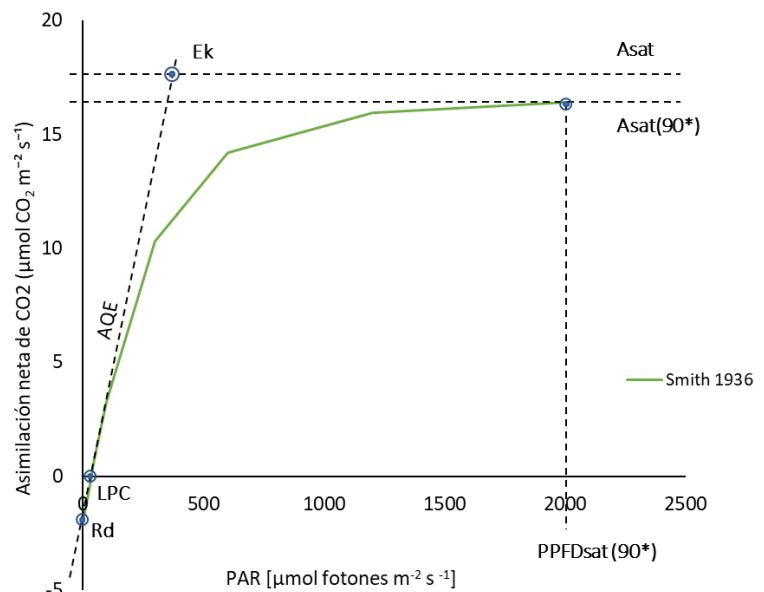
$$(6) \quad A_N = \frac{AQE \cdot (Asat + Rd) \cdot PPFD}{\sqrt{(AQE + PPFD)^2 + (Asat + Rd)^2}} - Rd$$

Donde *Asat* es la asimilación neta saturante e indica la máxima asimilación de carbono que se puede llevar a cabo; *AQE*, la eficiencia cuántica aparente, es decir, es el número de unidades de CO₂ fijadas por cada fotón. A partir de ella se determina la pendiente de la recta que corta con *Asat* y da lugar a *Ek*, el punto de inflexión de la luz, una constante que indica el nivel de PAR a la cual se empieza a saturar el fotosistema. Como realmente una función no

puede cortar nunca con la asíntota $Asat$, se calcula la densidad de flujo de fotones fotosintéticos al 90% ($PPFDsat\ 90^*$) ya que así se obtendrá un valor más exacto.

Rd corresponde a la respiración cuando la luz es nula y LPC , el punto de compensación de la luz, que estima a qué PAR la asimilación neta de carbono es 0. En la [Figura 2](#) se representa un ejemplo gráfico de una curva de luz basada en la anterior ecuación.

Figura 2. Curva de luz de fotosíntesis que muestra la relación entre la intensidad de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y la asimilación de CO_2 . Modelo de curva de luz de fotosíntesis basado en la ecuación (6) en el que se señalan los siguientes parámetros respiración en oscuridad (Rd); Asimilación de neta saturante al 90% ($Asat90^*$), Asimilación de neta saturante ($Asat$), Eficiencia cuántica aparente (AQE); Punto de inflexión de la luz (Ek); Punto de compensación de la luz (LPC); Densidad de flujo de fotones fotosintéticos al 90% ($PPFDsat\ 90^*$)



4.7. Medidas de las propiedades ópticas de las hojas

Para conocer el contenido de clorofilas y polifenoles se utilizó el DUALEX® Scientific (Force A, Francia), un instrumento no destructivo que permite determinar la cantidad de clorofilas (Chl), índice de flavonoides y antocianinas así como un índice del balance en nitrógeno (NBI) mediante la emisión de distintas longitudes de onda. Todas ellas: UV (200-400 nm) para flavonoides, verde (400-600) para antocianinas y rojo lejano (730 nm) para la clorofila, utilizan como referencia el infrarrojo cercano (NIR, 780 nm), no absorbido por ninguno de los componentes. Se utilizaron 6 hojas de especies de campo, a las cuales se le realizaron 6 medidas por el haz y el envés.

La absorptividad (Abs) es la relación entre el porcentaje de luz que alcanza los fotosistemas frente a la luz total incidente (Carter y Knapp, 2001). Con un IMAGING-PAM M-Series MINI-version (Walz GmbH, Alemania) se sometió al mismo número de individuos a un pulso de luz de infrarrojo cercano (NIR, 780 nm) y luz roja (R, 660 nm). El primero no es absorbida

mientras que el segundo sí por lo que, si ambas luces se emiten con la misma intensidad, se puede calcular la absorptividad a partir de la siguiente ecuación:

$$(7) \quad Abs = 1 - \frac{R}{NIR}$$

4.8. Determinación de la masa foliar por área

La masa foliar por área (LMA) es un parámetro muy relacionado con la tasa fotosintética (De La Riva et al., 2016)

Para poder calcular la masa foliar por área se utilizaron 6 de las hojas recogidas en campo. Se realizó una foto a escala, a partir de la cual se calculó el área foliar con el [Image J](#) y se tomaron los datos de peso fresco y peso seco tras 24 h en estufa a 60 °C en la balanza analítica AB54-S.

Para calcular el LMA se siguió la siguiente fórmula:

$$(8) \quad LMA = \frac{Ps}{\text{Área foliar}}$$

También con el peso fresco, se pudo conocer el contenido hídrico absoluto de la hoja.

4.9. Análisis estadístico

Todos los datos y figuras se analizaron con Microsoft Excel 2019. Para determinar la significancia de los resultados se utilizó Prueba T-student con un p-valor inferior a 0,05. Previamente se comprobó la homocedasticidad de los datos con un Test de Levene o ANOVA de un factor, perteneciente al complemento de Microsoft, Análisis de datos.

Para obtener los resultados asociados a la curva de luz, se activó otro complemento de Excel, el Solver, el cual permite aproximar a los valores numéricos más adecuados para que el error en el ajuste polinomial del modelo matemático de (Lobo et al., 2013) sea el mínimo.

5. Resultados

5.1. Propiedades hídricas del suelo.

Los resultados de los ensayos de la capacidad de campo en los suelos se muestran a continuación en la [Figura 3](#). En concreto, la 3.A y 3.B representan la relación entre el contenido hídrico y el potencial hídrico del suelo de Montaña Blanca y Alto Guajara respectivamente, durante su deshidratación controlada en el laboratorio. A partir de 0,2 gH₂O g⁻² PS, se comienza a ver un punto de inflexión en las muestras de Alto Guajara mientras que con las de Montaña Blanca, no es hasta 0.1 gH₂O g⁻¹ PS cuando empieza a disminuir el potencial. Esto quiere decir, que para un mismo contenido absoluto de agua de en torno a 0,1 gH₂O g⁻² PS, el suelo de Montaña Blanca tiene más agua disponible para las plantas que el suelo de Alto Guajara. No obstante, a potenciales muy bajos como -5.6 MPa, se hace evidente que la cantidad de agua de la Figura 3.A es la mitad que el de la 3.B.

El análisis de los suelos *in situ* reveló que el potencial hídrico de los suelos era similar, entre 0 y -0,15 MPa, si bien se observaba una tendencia en la que Alto Guajara mostraba una potenciales más altos que Montaña Blanca. Sin embargo, el contenido hídrico absoluto de los *cores* de 100 cm³ indica que existen diferencias significativas siendo superior en Montaña Blanca con $0,282 \pm 0,027$ gH₂O g⁻¹ PS que en Alto Guajara, $0,159 \pm 0,011$ gH₂O g⁻¹ PS.

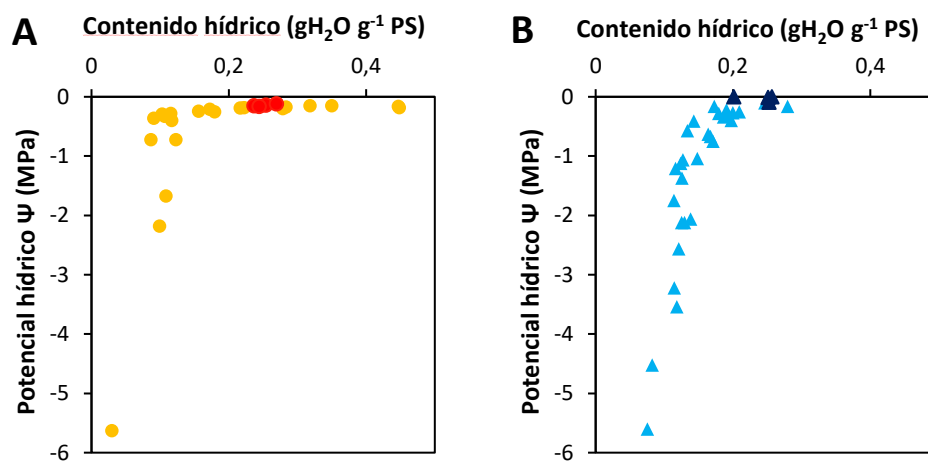


Figura 3: Curvas contenido hídrico vs. potencial hídrico del suelo de A) Montaña Blanca (*V. cheiranthifolia*) y B) Alto Guajara (*V. guaxarensis*) a partir de desecaciones controladas en el laboratorio de n=4 muestras diferentes por suelo. Los puntos rojos y azul marino corresponden a los datos del suelo *in situ* de Montaña Blanca y Alto Guajara respectivamente.

5.2. Propiedades de las semillas

5.2.1. Caracterización física de las semillas

En la [Figura 4](#) se muestra algunas de las semillas entregadas por el vivero de El Portillo. Las correspondientes a *V. cheiranthifolia* (Figura 4.A) posee un rango de colores en la testa, desde beige hasta un marrón café, sin embargo, en *V. guaxarensis* (Figura 4.B) solamente se pueden apreciar dos tonalidades de marrón pardo-oscuro.

Las dimensiones de la [Tabla 1](#) exponen que no se puede demostrar que haya diferencias significativas ni en la longitud ni en el ancho de la semilla entre ambas especies. En general los valores se encuentran en 1,8 – 1,85 mm de largo y 0,99 – 1 mm de ancho. No obstante, estas similitudes se ven alteradas en el peso ([Tabla 2](#)) donde se observan diferencias significativas en el peso promedio por semilla es de $1,7 \pm 3,6 \text{ E-5 mg}$ en *V. cheiranthifolia* (promedio \pm error estándar) y $1,9 \pm 4,7 \text{ E-5 mg}$ en *V. guaxarensis*.

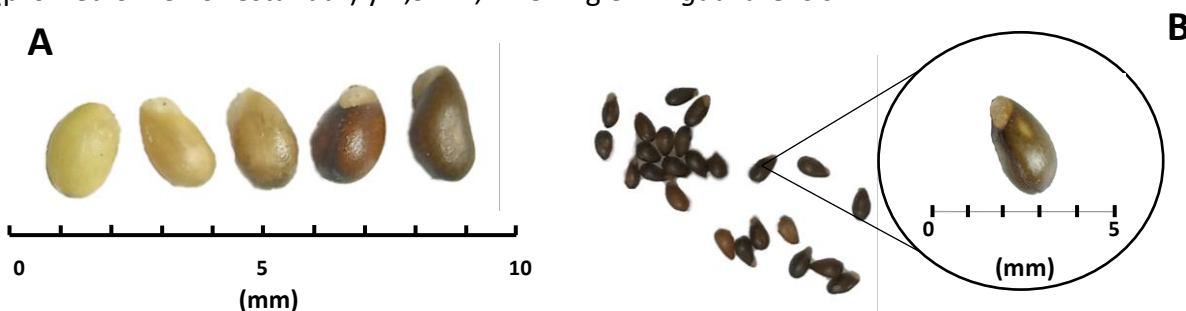


Figura 4 : Imágenes de las semillas de (A) *V. cheiranthifolia* y (B) *V. guaxarensis* mostrando la escala (mm).

Dimensiones (mm)		
Especie	Longitud	Ancho
<i>V. cheiranthifolia</i>	$1,81 \pm 0,05^a$	$1,062 \pm 0,03^a$
<i>V. guaxarensis</i>	$1,84 \pm 0,03^a$	$0,993 \pm 0,02^a$

Tabla 1: Estima de las dimensiones de las semillas de las dos especies de *Viola*. Se muestran los valores promedio \pm SE de n=12 para la longitud y ancho de cada especie. Diferentes letras junto a los valores indican la ausencia de diferencias significativas entre las dos especies ($p < 0.05$).

Peso promedio de distintos tamaños de muestras de semillas (mg)				
Especies	1 semilla	5 semillas	25 semillas	50 semillas
<i>V. cheiranthifolia</i>	$1,7 \pm 3,6 \text{ E-5}^a$	$8,9 \pm 0,2^a$	$42,0 \pm 0,3^a$	$80,6 \pm 0,5^a$
<i>V. guaxarensis</i>	$1,9 \pm 4,7 \text{ E-5}^b$	$10,4 \pm 0,2^a$	$44,8 \pm 0,2^b$	$91,1 \pm 0,4^b$

Tabla 2: Estima del peso de las semillas de las dos especies de *Viola* empleadas en este estudio. Los valores promedio \pm SE de $n=6$ se muestran para distintos tamaños muestrales compuestos por 5, 25 o 50 semillas en cada réplica. A partir de esos valores se estimó el peso promedio \pm ES de una semilla. Diferentes letras junto a los valores indican diferencias significativas entre especies ($p<0.05$).

5.2.2. Tasa de germinación

En la [Figura 5](#) se representa la variación temporal de la germinación de ambas especies, sembradas en placa Petri y en condiciones controladas en el laboratorio ([Ver detalles en los Métodos](#)). A pesar de que las semillas comienzan a germinar a partir del sexto día, a medida que transcurren los días, es evidente que la tasa de germinación de *V. guaxarensis* es superior a *V. cheiranthifolia*. De hecho, un T-student demuestra que hay diferencias significativas ($p<0.05$) en la germinación de ambas especies desde el día 6.

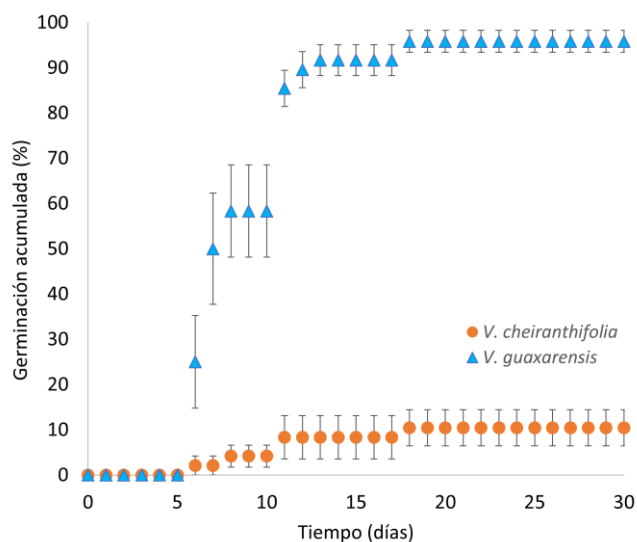


Figura 5: Tasa de germinación de las dos especies de *Viola* monitorizada durante 30 días. Valores promedio \pm SE de $n=4$ de 12 semillas cada muestra. La tasa de germinación se monitorizó durante 30 días en laboratorio a temperatura y PAR constantes ([Ver Métodos para más detalles](#)). Las diferencias fueron significativas entre especies a partir del día 6 ($p<0.05$).

Mientras que el máximo en *V. cheiranthifolia* apenas se alcanza el 11% ($10,4 \pm 4,0$), en *V. guaxarensis* llega a un $95,8 \pm 2,4$ %. El mayor incremento en la tasa de germinación de esta última ocurre entre el quinto y doceavo día, donde se experimentó una subida del 90%. A partir de este momento, la tasa de germinación se estabilizó notablemente en ambas especies y no se observó ningún aumento después del día 18.

5.3. Densidad vascular y estomática

En la [Figura 6](#) se muestran fotos representativas de las hojas tras su preparación para estimar la densidad vascular y estomática ([Ver detalles en Métodos](#)). Se ha encontrado hasta un 5º orden vascular en las hojas. Un T-student determinó que no había diferencias significativas en relación con la densidad vascular y estomática, sin embargo, en la [Tabla 3](#) se

observa que *V. guaxarensis* posee unos valores superiores a *V. cheiranthifolia* en ambos aspectos.

Especie	DV (mm mm ⁻²)	DE (estomas mm ⁻²)
<i>V. cheiranthifolia</i>	3,6 ± 0,3 ^a	46,3 ± 2,1 ^a
<i>V. guaxarensis</i>	4,2 ± 0,4 ^a	50,6 ± 2,4 ^a

Tabla 3: Estimación de la densidad vascular (DV) y estomática (DE) de las dos especies de *Viola*. Valores promedio ± SE de n=6 de hojas de individuos proporcionadas por el vivero del El Portillo. Las letras junto a los valores indican que no se encontraron diferencias significativas entre las dos especies ($p < 0.05$).

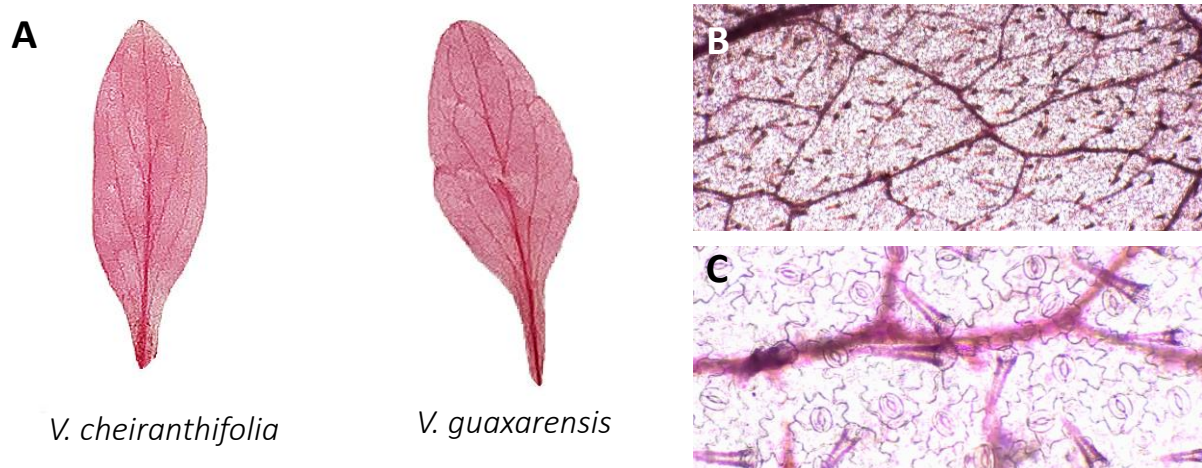


Figura 6. Foto representativa de hojas de ambas especies de *Viola* tras su preparación para estimar la densidad vascular y estomática. Se decoloraron con 5% NaOH, 5% NaClO, se realizaron deshidrataciones sucesivas de etanol 30 %, 50%, 70%, 100% y se tiñeron con 1% safranina y 1% fast green en etanol 100%. A) Hoja de *V. cheiranthifolia* (derecha) y *V. guaxarensis* (izquierda) B) Imagen microscópica a objetivo 4X de *V. cheiranthifolia* donde se aprecian tricomas y venas de hasta 5º orden C) Imagen microscópica a objetivo 10X de *V. guaxarensis* con estomas y células epidérmicas, tricomas y venas.

5.4. Curvas de luz

La curva de luz de fotosíntesis muestra la relación entre la asimilación neta de CO₂ y la intensidad de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) de las dos especies de *Viola*. La [Figura 7](#) muestra la curva formada por el ajuste polinomial de los puntos correspondientes a la media ± SE a determinada PAR para n=6.

A pesar de que a 2000 μmol fotones m⁻² s⁻¹ se aprecia una ligera tendencia en la asimilación neta de CO₂ de *V. guaxarensis* (26,4 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) sobre *V. cheiranthifolia* (22,4 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), un T-student demostró que no hay diferencias significativas. En ausencia de PAR, los valores de asimilación neta de CO₂ son similares, de -1,3 y -1,6 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ para *V. cheiranthifolia* y *V. guaxarensis*. Los valores de asimilación neta negativos indican la respiración de la hoja mientras que los positivos, fotosíntesis.

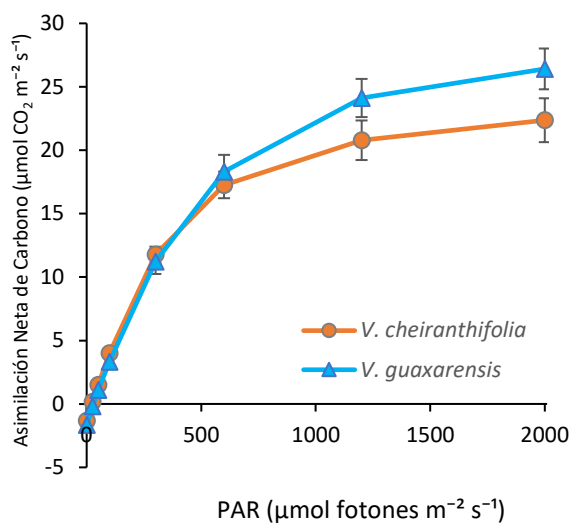


Figura 7: Curva de luz de fotosíntesis que muestra la relación entre la intensidad de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y la asimilación de CO₂. Ajuste polinomial de curva de luz a partir de la ecuación (6) de n=6 individuos de *V. cheiranthifolia* y *V. guaxarensis*. Se muestran valores promedio \pm SE de asimilación neta de carbono a un determinado PAR. No se encontraron diferencias significativas entre las dos especies ($p < 0,05$)

Media	Asat ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	AQE	Ek ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	LCP ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	PPFDsat (90*) ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
<i>V. cheiranthifolia</i>	$22,7 \pm 0,8^a$	$0,052 \pm 0,001^a$	$435,2 \pm 14,8^a$	$25,5 \pm 2,4^a$	$983,4 \pm 68,6^a$
<i>V. guaxarensis</i>	$27,7 \pm 0,7^a$	$0,048 \pm 0,002^a$	$598,4 \pm 28,0^a$	$36,3 \pm 2,7^a$	$1355,8 \pm 162,0^a$

Tabla 4: Parámetros obtenidos a partir de la curva de luz mostrada en la Figura 7 cuyo ajuste se basa en el modelo de Smith (1936). Valores promedio \pm SE de n=6 para los siguientes parámetros: Asimilación de neta saturante (Asat), Eficiencia cuántica aparente (AQE); Punto de inflexión de la luz (Ek); Punto de compensación de la luz (LPC); Densidad de flujo de fotones fotosintéticos al 90% (PPFDsat 90*). Las letras junto a los valores indican que no se encontraron diferencias significativas entre las dos especies ($p < 0,05$).

Dado también ese ajuste polinomial de la Ecuación 6 generado a partir de los modelos matemáticos de (Lobo et al., 2013) basados en el modelo (Smith, 1936), se pudo obtener los siguientes parámetros plasmados en la Tabla 4. En principio, no se puede demostrar que haya diferencias significativas si bien, en el caso de la máxima asimilación neta de carbono (Asat), punto de inflexión de la luz (Ek) y flujo de fotones al 90% (PPFDsat 90*), un T- student con un nivel de significación de $p < 0,05$ demostró que los valores obtenidos se acercaban mucho al límite del p-valor.

En general, se observa una ligera tendencia de *V. guaxarensis* sobre *V. cheiranthifolia* en relación con la asimilación neta de carbono en saturación. En cambio, la pendiente de la AQE es más vertical en *V. cheiranthifolia* que *V. guaxarensis*, lo cual concuerda con que el punto de inflexión de la luz sea menor en el caso de la primera. El punto de compensación de la luz

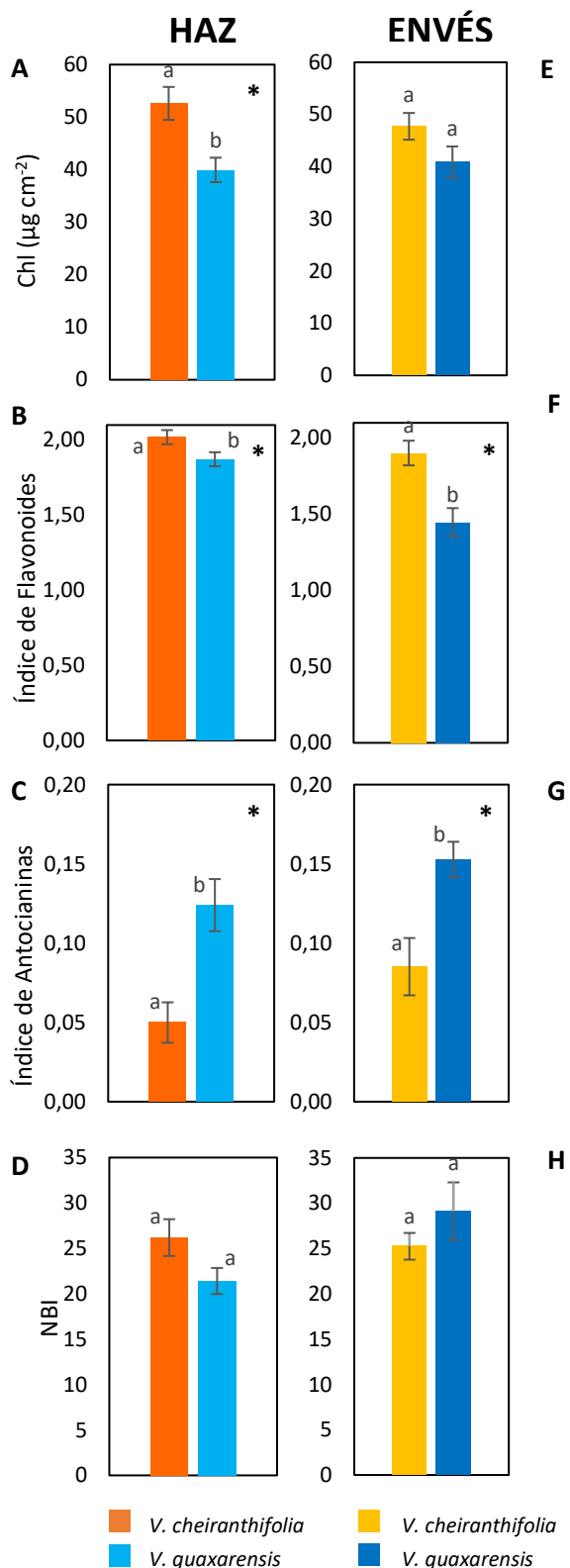


Figura 8. Propiedades ópticas de *V. cheiranthifolia* y *V. guaxarensis*. Se comparan diferentes parámetros [Chl (contenido en clorofilas), índice de Flavonoides, Índice de Antocianinas y NBI (índice de balance en nitrógeno)], obtenidos mediante medidas ópticas, entre las especies y entre el haz y el envés dentro de cada especie. A-D corresponde a las medidas del haz. E-H son datos del envés. Diferentes letras junto a los valores indican diferencias significativas entre las dos especies ($p < 0.05$).

indica que *V. cheiranthifolia* tiene valores inferiores a *V. guaxarensis*, lo cual contribuye a saber que esta última empieza a respirar más que a fotosintetizar a menos de $36,3 \pm 2,7 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mientras que la primera lo hace a partir de $25,5 \pm 2,4 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La densidad de flujo de fotonos fotosintéticos al 90% muestran que la asimilación neta de carbono en *V. guaxarensis* satura a más de $1355 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a diferencia de *V. cheiranthifolia*, donde apenas llega a los $1000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

5.5. Propiedades ópticas

En la [Figura 8](#) se representan los datos del contenido en clorofilas y el índice de flavonoides, antocianinas y NBI del haz y envés de 6 hojas de 6 individuos de cada especie obtenidos con el DUALEX Scientific. Se han encontrado diferencias significativas a partir de un T-student ($p < 0,05$) principalmente en el índice de flavonoides y antocianinas tanto en la parte superior como inferior de las hojas.

En relación con las clorofilas (Chl), solamente se observan desigualdades en el haz mientras que en el índice de balance en nitrógeno (NBI) parece ser similar en ambas especies. En general, los valores de clorofilas, flavonoides y NBI (haz) son superiores en *V. cheiranthifolia*. No obstante, *V. guaxarensis* lo es en el índice de antocianinas y NBI (envés).

	<i>V. cheiranthifolia</i>	<i>V. guaxarensis</i>
Abs	0,761 ± 0,011 ^a	0,813 ± 0,002 ^b

Tabla 5: Estima de valores promedio ± SE de absortividad (Abs) de $n=6$ para cada especie. Diferentes letras junto a los valores indican diferencias significativas entre ambas especies ($p<0.05$).

Los valores de absortividad obtenidos mediante el IMAGING-PAM fueron significativos según se observa en la [Tabla 5](#). *V. guaxarensis* tiene un mayor valor que *V. cheiranthifolia*, por lo que quiere decir que más cantidad de luz roja es capaz de alcanzar sus fotosistemas.

5.6. Masa foliar por área

A partir de un T-student se determinaron diferencias significativas en la masa foliar por área (LMA). En este caso, se aprecia que en la [Tabla 6](#), *V. cheiranthifolia* tiene aproximadamente más de 10 g de masa por m^2 que *V. guaxarensis*.

	<i>V. cheiranthifolia</i>	<i>V. guaxarensis</i>
LMA (g m^{-2})	105,9 ± 4,8 ^a	91,4 ± 4,2 ^b

Tabla 6: Estima de valores promedio ± SE de masa foliar por área (LMA) de $n=6$ para cada especie. Diferentes letras junto a los valores indican diferencias significativas entre ambas especies ($p<0.05$).

6. Discusión

Con este TFG se pretende aumentar el escaso conocimiento relativo a la ecofisiología de dos especies endémicas del Teide *Viola Cheiranthifolia* Humb. & Bonpl y *Viola guaxarensis* Marrero, Docoito & Díaz. De hecho, hasta la fecha únicamente un trabajo anterior Gómez et al., (2020) ha realizado un estudio comparativo entre las tres especies de *Viola* de alta montaña en Canarias.

Los ecosistemas alpinos se caracterizan por una alta irradiancia y bajas temperaturas, sin embargo, en el contexto de cambio climático, se ha observado el aumento de especies no nativas en estas comunidades (Lembrechts et al., 2016). Las poblaciones de *V. cheiranthifolia*

y sobre todo, de *V. guaxarensis*, son muy limitadas por lo que es esencial conocer sus características ecofisiológicas para promover planes de recuperación y conservación. En este trabajo se han cubierto con una perspectiva muy amplia varios de los aspectos ecofisiológicos más relevantes de ambas especies como son la potencialidad de germinación de sus semillas, la capacidad fotosintética y algunas de las principales propiedades hídricas, ópticas y anatómicas de sus hojas. El estudio se ha complementado además, con una caracterización hídrica de las características del suelo de dos poblaciones.

6.1 Propiedades hídricas del suelo

Según Rodríguez et al. (2014), en El Parque Nacional del Teide se pueden encontrar 11 tipos taxonómicos de suelos siguiendo las unidades de la WRB (World Reference Base for Soil Resources) con predominancia de Leptosoles. Los resultados más significativos mostraron altos contenidos de arena, capacidad moderada o baja de disponibilidad de agua y así como de carbono y nitrógeno, si bien, hay un gran potencial para secuestrar carbono. Es importante destacar bajos valores de intercambio de cationes, lo que provoca inevitablemente deficiencias en plantas no adaptadas.

Tanto en Montaña Blanca como Alto Guajara predominan regosoles con un régimen ústico (comunicación personal del Dr. Jesús S. Notario del Pino), es decir, suelos con un escaso desarrollo sobre coladas lávicas de composición diversa que se caracterizan por tener disponible agua en el período de crecimiento vegetal (Porta Casanellas et al., 2003). Según la Soil Taxonomy, se trataría de Ustorthents.

A pesar de las distintas estaciones en las que se muestrearon los suelos - Montaña Blanca en julio y Alto Guajara en abril- se observa que el primero tiene mayor contenido hídrico que el segundo. En ambos casos, los suelos se encontraban recubiertos por rocas. Tal y como se demuestra Tejedor et al. (2003) y Wang et al. (2012), este mantillo de rocas influye en la capacidad de retención del agua permitiendo conservar el líquido, reduciendo la evaporación y actuando como protector del suelo. La diferencia en el contenido hídrico es seguramente debido a que el mantillo cubre Montaña Blanca es mucho más amplio y espeso que el de Alto Guajara. De hecho, gracias a él se podría explicar por qué hay más agua disponible en el primer lugar, donde se encuentra *V. cheiranthifolia*, cuando tal y como se exponen en la Figura 3.A y 3.B, la capacidad de retención del suelo de Montaña Blanca es inferior. Queda patente que un pequeño descenso en el contenido hídrico provoca que el

potencial hídrico de Alto Guajara disminuya precipitadamente. Esto quiere decir que a un mismo contenido hídrico, *V. guaxarensis* tendría que invertir más energía en captar agua del suelo que *V. cheiranthifolia*. Otro de los motivos podría ser la textura o el contenido en aluminosilicatos, sin embargo, es poco probable teniendo en cuenta que se trata del mismo tipo de suelos.

6.2 Propiedades de las semillas y germinación

Las dimensiones de las semillas tienen gran importancia en el desarrollo de la planta así como en otros procesos como la dispersión, fecundidad, crecimiento y depredación: por ejemplo, las semillas pequeñas son mucho más fáciles de producir y dispersar, pero a su vez tienen menor tolerancia a estreses como la sequía (Zeng et al., 2022).

En este caso, las dimensiones de las semillas de *V. cheiranthifolia* y *V. guaxarensis* son similares. No obstante, sí que existen diferencias significativas en el peso de estas. Una de las razones puede ser la madurez de la propia semilla. A pesar de que se recolectaron el mismo período (julio 2020) con tal sólo una semana de separación entre ellas y tal y como se muestra en la [Figura 4](#), *V. cheiranthifolia* mostró diferentes colores en la testa debido seguramente a los distintos grados de desarrollo. A diferencia de ella, las semillas de *V. guaxarensis* sí que parecían estar en su momento óptimo para su dispersión. Queda evidente en el ensayo de germinación, donde *V. cheiranthifolia* apenas llegó al 11%.

Otro motivo puede ser la ausencia de vernalización ya que son especies de alta montaña y para evitar el desarrollo temprano de las semillas, suele ser necesario someterlas a un largo período constante a bajas temperaturas (Cavieres & Sierra-Almeida, 2018). En tal caso, debería realizarse una estratificación en frío para comprobar si este fuera un factor limitante en su desarrollo.

6.3 Características foliares

La venación es un sistema vascular dentro de la hoja que intervienen en su soporte mecánico de la hoja y en su intercepción de la luz y cuyas funciones son el transporte de sustancias como agua o metabolitos fotoasimilados (Kawai & Okada, 2016). La densidad vascular o *vein length per area* (VLA) es una medida que determina diversos parámetros de una hoja: la conductividad hidráulica, dureza, uso de agua, intercambio de gases y conductancia estomática y está correlacionado, entre otros, con la tasa fotosintética, el

coste de producción foliar, la defensa física (Li et al., 2018). La jerarquía vascular es importante ya que se ha visto que la venación superior (1^o-3^o orden) está relacionado con la tolerancia a la desecación mientras que las dos primeras (sólo 1^o y 2^o) con *leaf nitrogen per unit mass (N_{mass})*, *leaf life span (LL)* y *leaf mass per area (LMA)* (Walls 2011). Además Kawai & Okada (2016) demuestra que mientras que la densidad vascular de 1^{er} y 2^{ndo} orden influyen en las propiedades mecánicas y estructurales de la hoja. La densidad de las venas menores (de 3^o en adelante) lo hacen sobre el control del agua y la capacidad de intercambio de gases.

A diferencia de los resultados que se observan en las herbáceas alpinas de Wang et al. (2020), los valores de densidad vascular de las dos especies de *Viola* tinerfeñas son muy bajos ya que no llegan a los 5 mm mm⁻². De hecho, se acercan mucho más a los datos obtenidos por Scoffoni et al. (2011) para *Heredia canariensis*, una especie de hiedra típica de la laurisilva y fayal-brezal, que a la alta densidad vascular que suele caracterizar las hojas pequeñas, las cuales le confieren menor vulnerabilidad frente al embolismo y mayor tasa en la asimilación neta de CO₂ (*Asat*). Además, tanto la *Asat* como la densidad vascular está muy correlacionado con la densidad estomática. Los estomas están relacionados con la hidráulica de la hoja y la fotosíntesis ya que el intercambio de vapor de agua y de CO₂ se realiza a través de ellos (Li et al., 2018). En este caso, se observa una densidad muy inferior a la registradas en los siguientes artículos Cardoso et al. (2018); Li et al. (2018) y Zhang et al. (2020) para 41 especies. Otra variable muy correlacionada con los otros parámetros es la masa foliar por área (LMA). A pesar de los valores anormales registrados en la densidad vascular y estomática, los resultados de LMA muestran diferencias significativas entre ambas especies siendo superior *V. cheiranthifolia*. Aun así, la variable LMA es muy alta con respecto a Wang et al. (2020) pero se encuentra dentro de los rangos establecidos por Wright et al. (2004), es decir, entre 30-130 g m⁻². Altos valores de LMA indican mayor tasa fotosintética, almacenamiento de nutrientes y resistencia a la desecación aunque puede limitar la difusión del agua de las venas al mesófilo.

La baja densidad vascular y estomática no concuerdan con las curvas de luz obtenidas, donde se observa una *Asat* muy alta, superior a los 20 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹. Es incluso alta con respecto a otras especies de alta montaña como se prueba en Shen et al. (2019). En general, hay un buen ajuste de la curva en las dos especies, sin diferencias significativas entre ellas, si

bien, se observa una ligera tendencia superior en algunos parámetros de *V. guaxarensis* sobre *V. cheiranthifolia*. Aun así, la AQE indica que a intensidades de PAR más bajas, *V. cheiranthifolia* es más eficiente que *V. guaxarensis*, lo que a su vez contribuye a que el fotosistema se empiece a saturar antes. Los valores del LCP señalan que la respiración de *V. guaxarensis* supera a la fotosíntesis a menos de $36.3 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mientras que con *V. cheiranthifolia* es a partir de $25.5 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin embargo, en la PPF (90*), los resultados se invierten. Una posible conclusión a la que se puede llegar es que estas adaptaciones son producto de la altitud. Alto Guajara se encuentra 350 m por encima de Montaña Blanca. El PAR que recibe, por lo tanto, es ligeramente superior, se ahí que los valores de Asat y PPF (90*) sean más altos en *V. guaxarensis* que en *V. cheiranthifolia*, sin embargo, al mismo tiempo esta última fija más CO₂ por fotón y puede realizar la fotosíntesis a PAR inferiores que la violeta de Alto Guajara, en la cual la respiración puede predominar.

A pesar de que los datos con respecto a la asimilación neta de carbono concuerdan con el hábitat donde se encuentran, algunas de las características estructurales de las hojas (densidad vascular y estomática) no lo hacen. Es verdad que el aumento de altitud también puede ser responsable de la disminución de estomas (Zhang et al., 2020) o incluso la edad de las hojas analizadas (Cardoso et al., 2018), sin embargo, se sospecha que la principal razón es el material utilizado ya que para calcular las densidades, se escogieron 6 hojas de cada especie procedentes del Vivero de El Portillo, lo cual podría explicar por qué no han desarrollado un sistema vascular y estomático tan adaptado a la sequía de alta montaña (aunque tampoco concuerda con el tamaño de la hoja).

6.4 Propiedades ópticas

Si comparamos los valores de absorptividad con las especies utilizadas en el estudio de Perera-Castro et al. (2017) para especies del mismo Parque Nacional de Teide, se puede comprobar que posee datos similares con *Erysinum scoparium*. De hecho, en Montaña Blanca se encontraron ejemplares cerca de la *V. cheiranthifolia*. Esto indica que los tricomas de las hojas de *V. cheiranthifolia* y *V. guaxarensis* contribuyen a que toda la luz que recibe la hoja sea reflejada y no sea absorbida por el PSII.

La cantidad de clorofilas en el haz que presenta *V. cheiranthifolia* es superior a *V. guaxarensis* al igual que ocurre con el LMA. Esto no concordaría con respecto a lo recogido por la curva de luz, donde Asat es superior en la segunda. Ya Buttery & Buzzell (1977)

demostraba una correlación positiva entre la cantidad de clorofila y tasa fotosintética. En el envés sin embargo, no hay diferencias significativas aunque sigue una tendencia similar al haz. El índice de flavonoides muestra similares conclusiones pero con desigualdades mucho más evidentes tanto en el haz como en el envés. *V. cheiranthifolia* por lo tanto muestra más pigmentación que *V. Guaxarensis*, sin embargo, esta última posee un mayor índice en antocianinas, indicando que probablemente invierte más energía en la producción de este compuesto frente a otros confiriéndole fotoprotección frente al daño por fotoinhibición y fotooxidación bajo altas radiaciones (Mannino et al., 2021; Steyn et al., 2002). La altitud podría ser uno de los motivos ya que Alto Guajara se encuentra a 350 m sobre Montaña Blanca.

Por último, los resultados con respecto al NBI no son concluyentes ya que mientras que *V. cheiranthifolia* tiene un mayor valor en el haz, *V. guaxarensis* lo tiene en el envés. Una de las razones podría ser la cantidad de nitrógeno existente en el suelo, no obstante, según Rodríguez et al. (2014), en ambos lugares hay bajos niveles de este elemento.

Cabe destacar que, excepto en el caso del balance de nitrógeno, en todos los casos las medidas del haz son superiores al del envés. Aun así, los valores de clorofila y flavonoides son muy altos por ambos lados con diferencias mínimas. La orientación de las hojas puede ser la responsable de esta respuesta ya que se sitúan en un ángulo cerrado con respecto al tallo, provocando que parte de la radiación incida en el envés.

Conclusiones

- El suelo de ambas localidades se encontraba prácticamente saturado de agua durante los muestreos. El suelo de Montaña Blanca tiene menor capacidad de retención de agua aunque la disponibilidad de agua para las plantas de *Viola* es mayor que en Alto Guajara (mayor potencial hídrico) para un contenido absoluto de agua en torno a $0,1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ PS}$.
- Las semillas de *V. guaxarensis* mostraron una tasa de germinación significativamente mayor que las de *V. cheiranthifolia*. Si estas diferencias se deben a haber sido cosechadas en distinto estado de desarrollo/maduración o a diferencias fisiológicas (ejemplo: dormancia) requiere un estudio futuro más profundo.

- No se detectaron diferencias en la densidad vascular y estomática de las hojas pero sí en su masa foliar por área entre ambas especies siendo más elevados los valores en *V. cheiranthifolia*.
- En las curvas de luz de fotosíntesis *V. guaxarensis* mostró una tendencia con mayores valores que *V. cheiranthifolia* pero dichas diferencias no fueron significativas en las condiciones del estudio actual.
- Hay una mayor absorptividad e índice de antocianinas en las hojas de *V. guaxarensis* mientras que en la hojas de *V. cheiranthifolia* hay un mayor contenido de flavonoides y clorofila.

Conclusions

- Soil of both locations was water saturated during samples. Montaña Blanca soil has less water retention capacity however, water available for *Viola* plants was higher than Alto Guajara soil (higher hydric potential) for water content around 0,1gH₂O g⁻¹ DW.
- *V. guaxarensis* seeds significantly show germination rate higher than *V. cheiranthifolia*. If these differences are because of being harvested in different development / maturation state or physiology differences (for instance: dormancy) needs a deeper future study.
- There were not significantly differences in leaves vascular and stomatal density but there were in leaf mass per area between both species being higher *V. cheiranthifolia* values.
- *V. guaxarensis* photosynthetic light response curve show tendency with higher *V. cheiranthifolia* values, but these differences were not significantly in actual conditions study.
- There are higher absorptivity and anthocyanin index in *V. guaxarensis* leaves meanwhile *V. cheiranthifolia* leaves have more flavonoids and chlorophyll content.

Bibliografía

Acebes, J. R., León, M. C., Rodríguez, M. L., Del Arco, M., García, A., Pérez la Paz, P., Rodríguez, O., Martín, V., & Widprett, W. (2009). Pteridofita, Spermatofita. In M. Arechavaleta, S. Rodríguez, N. Zurita, & A. García,

Lista de Especies Silvestres de Canarias. Hongos, Plantas y Animales terrestres (Gobierno de Canarias, pp. 119–172).

- Alexander, J. M., Lembrechts, J. J., Cavieres, L. A., Daehler, C., Haider, S., Kueffer, C., Liu, G., McDougall, K., Milbau, A., Pauchard, A., Rew, L. J., & Seipel, T. (2016). Plant invasions into mountains and alpine ecosystems: current status and future challenges. *Alpine Botany*, *126*, 89–103. <https://doi.org/10.1007/s00035-016-0172-8>
- Buttery, B. R., & Buzzell, R. I. (1977). The relationship between chlorophyll content and rate of photosynthesis in soybeans. *Canadian Journal Of Plant Science*, *57*, 1–5.
- Byers, A. (2014). Contemporary Human Impacts on Subalpine and Alpine Ecosystems of the Hinku Valley, Makalu-Barun National Park and Buffer Zone, Nepal. *Himalaya, the Journal of the Association for Nepal and Himalayan Studies*, *33*, 25–41. https://www.climatelinks.org/sites/default/files/asset/document/Contemporary.Human_.Impacts.on_.S_ubalpine.and_.Alpine.Ecosystems.of_.the_.Hinku_.Valley.Makalu-Barun.National.Park_.Nepal_.pdf
- Calanca, P. (2007). Climate change and drought occurrence in the Alpine region: How severe are becoming the extremes? *Global and Planetary Change*, *57*, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2006.11.001>
- Cardoso, A. A., Randall, J. M., Jordan, G. J., & McAdam, S. A. M. (2018). Extended differentiation of veins and stomata is essential for the expansion of large leaves in *Rheum rhabarbarum*. *American Journal of Botany*, *105*(12), 1967–1974. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1196>
- Cavieres, L. A., & Sierra-Almeida, A. (2018). Assessing the importance of cold-stratification for seed germination in alpine plant species of the High-Andes of central Chile. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *30*, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2017.09.005>
- Chen, N., Zhang, Y., Zu, J., Zhu, J., Zhang, T., Huang, K., Cong, N., Wang, Z., Li, J., Zheng, Z., Tian, Y., Wang, L., Zhao, G., Liu, Y., Xu, M., Tang, Z., Zhu, Y., & Chen, Y. (2020). The compensation effects of post-drought regrowth on earlier drought loss across the tibetan plateau grasslands. *Agricultural and Forest Meteorology*, *281*, 107822. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2019.107822>
- Chen, X., Qian, L., Zhang, Y., Shi, H., Sun, H., & Chen, J. (2021). Alpine community recruitment potential is determined by habitat attributes in the alpine ecosystems of the Himalaya-Hengduan Mountains, SW China. *Ecology and Evolution*, *11*, 17397–17408. <https://doi.org/10.1002/ece3.8373>
- De La Riva, E. G., Olmo, M., Poorter, H., Ubersa, J. L., & Villar, R. (2016). Leaf mass per area (LMA) and its relationship with leaf structure and anatomy in 34 mediterranean woody species along a water availability gradient. *PLoS ONE*, *11*(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148788>
- Dey, P., Datta, D., Pattnaik, D., Dash, D., Saha, D., Panda, D., Bhatta, B. B., Parida, S., Mishra, U. N., Chauhan, J., Pandey, H., & Singhal, R. K. (2022). Physiological, biochemical, and molecular adaptation mechanisms of photosynthesis and respiration under challenging environments. In T. Aftab & A. Roychoudhury, *Plant Perspectives to Global Climate Changes* (79–100). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85665-2.00003-0>
- Fernández-Marín, B., Gullás, J., Figueroa, C. M., Iñiguez, C., Clemente-Moreno, M. J., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., Cavieres, L. A., Bravo, L. A., García-Plazaola, J. I., & Gago, J. (2020). How do vascular plants perform photosynthesis in extreme environments? An integrative ecophysiological and biochemical story. *The Plant Journal*, *101*, 979–1000. <https://doi.org/10.1111/tpj.14694>
- Fu, J., Gates, R. N., Xu, Y., & Hu, T. (2016). Diffusion limitations and metabolic factors associated with inhibition and recovery of photosynthesis following cold stress in *Elymus nutans* Griseb. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *163*, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.008>
- Gómez, M. V. M., Esquivel, J. L. M., Díaz, J. R. D., & Izquierdo, M. S. (2020). *Viola guaxarensis* (Violaceae): A new *Viola* from Tenerife, Canary Islands, Spain. *Willdenowia*, *50*, 13–21. <https://doi.org/10.3372/wi.50.50102>
- González-Rodríguez, Á. M., Pérez-Martín, E. M., Brito, P., & Fernández-Marín, B. (2021). Unexpected vulnerability to high temperature in the mediterranean alpine shrub *Erysimum scoparium* (Brouss. ex Willd.) Wettst. *Plants*, *10*, 379. <https://doi.org/10.3390/plants10020379>

- Hickey, L. J. (1973). Classification of the Architecture of Dicotyledonous Leaves. *American Journal of Botany*, *60*, 17–33. <http://www.jstor.org/stable/2441319>
- Irl, S. D. H., Harter, D. E. V., Steinbauer, M. J., Gallego Puyol, D., Fernández-Palacios, J. M., Jentsch, A., & Beierkuhnlein, C. (2015). Climate vs. topography - spatial patterns of plant species diversity and endemism on a high-elevation island. *Journal of Ecology*, *103*, 1621–1633. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12463>
- Kawai, K., & Okada, N. (2016). How are leaf mechanical properties and water-use traits coordinated by vein traits? A case study in Fagaceae. *Functional Ecology*, *30*, 527–536. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12526>
- Körner, C. (2021). Alpine Plant Life. In *Alpine Plant Life*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-59538-8>
- La Manna, L., Tarabini, M., Gomez, F., Noli, P., Vogel, B., & Buduba, C. (2018). Estimación de la capacidad de retención de agua de suelos volcánicos en función de variables de fácil determinación a campo. *Asociación Argentina Ciencia Del Suelo*, *36*, 23–29.
- Lembrechts, J. J., Pauchard, A., Lenoir, J., Nuñez, M. A., Geron, C., Ven, A., Bravo-Monasterio, P., Teneb, E., Nijs, I., & Milbau, A. (2016). Disturbance is the key to plant invasions in cold environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(49), 14061–14066. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608980113>
- Li, F., McCulloh, K. A., Sun, S., & Bao, W. (2018). Linking leaf hydraulic properties, photosynthetic rates, and leaf lifespan in xerophytic species: a test of global hypotheses. *American Journal of Botany*, *105*(11), 1858–1868. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1185>
- Lobo, F. de A., de Barros, M. P., Dalmagro, H. J., Dalmolin, Â. C., Pereira, W. E., de Souza, É. C., Vourlitis, G. L., & Rodríguez Ortiz, C. E. (2013). Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel - a critical look at the models. *Photosynthetica*, *51*(3), 445–456. <https://doi.org/10.1007/s11099-013-0045-y>
- López Díez, A., Dorta Antequera, P., Febles Ramírez, M., & Díaz Pacheco, J. (2016). Los procesos de adaptación al cambio climático en espacios insulares: el caso de Canarias. In *X Congreso Internaciones AEC: Clima, sociedad, riesgos y ordenación del territorio* (pp. 535–544). Servicio de Publicaciones de la UA. <https://doi.org/10.14198/xcongresoaealicante2016-50>
- Mannino, G., Gentile, C., Ertani, A., Serio, G., & Bertea, C. M. (2021). Anthocyanins: Biosynthesis, distribution, ecological role, and use of biostimulants to increase their content in plant foods—a review. *Agriculture*, *11*, 212. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030212>
- Marcussen, T., Heier, L., Brysting, A. K., Oxelman, B., & Jakobsen, K. S. (2015). From gene trees to a dated allopolyploid network: Insights from the angiosperm genus *Viola* (Violaceae). *Systematic Biology*, *64*, 84–101. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syu071>
- Martín-Esquível, J. L., & Pérez González, M. J. (2019). *Cambio climático en Canarias*. Turquesa.
- Mecke, M., Westman, C. J., & Ilvesniemi, H. (2002). Water Retention Capacity in Coarse Podzol Profiles Predicted from Measured Soil Properties. *Soil Science Society of America Journal*, *66*, 1–11. <https://doi.org/10.2136/sssaj2002.1000>
- Perera-Castro, A. V., Brito, P., & González-Rodríguez, Á. M. (2017). Light response in alpine species: Different patterns of physiological plasticity. *Flora*, *234*, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.07.007>
- Porta Casanellas, J., López-Acevedo Reguerín, M., & Roquero De Laburu, C. (2003). *Edafología: para la agricultura y el medio ambiente* (3rd ed.). Mundi-Prensa.
- Rodríguez-Rodríguez, P., De Castro, A. G. F., Seguí, J., Traveset, A., & Sosa, P. A. (2019). Alpine species in dynamic insular ecosystems through time: Conservation genetics and niche shift estimates of the endemic and vulnerable *Viola cheiranthifolia*. *Annals of Botany*, *123*, 505–519. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy185>

- Rodríguez-Rodríguez, P., González-Pérez, M. A., Culley, T. M., Carqué, E., & Sosa, P. A. (2015). Isolation and characterization of 16 microsatellite loci in the endemic *Viola cheiranthifolia* Humb. & Bonpl. (Violaceae) and their transferability to *Viola palmensis* Web & Berthel. *Conservation Genetics Resources*, 7, 455–458. <https://doi.org/10.1007/s12686-014-0394-2>
- Rodríguez, N., Notario, J., Arbelo, C. D., Rodríguez-Rodríguez, A., & Guerra, J. A. (2014). Spatial variability of soil properties and soils classification in Teide National Park (Tenerife, Canary Islands). *Research Gate*, 191–196. <https://doi.org/10.1201/b16500-37>
- Scoffoni, C., Rawls, M., Mckown, A., Cochard, H., & Sack, L. (2011). Decline of leaf hydraulic conductance with dehydration: Relationship to leaf size and venation architecture. *Plant Physiology*, 156, 832–843. <https://doi.org/10.1104/pp.111.173856>
- Seguí, J., López-Darias, M., Pérez, A. J., Nogales, M., & Traveset, A. (2017). Species-environment interactions changed by introduced herbivores in an oceanic high-mountain ecosystem. *AoB PLANTS*, 9. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw091>
- Shen, H., Dong, S., Li, S., Xiao, J., Han, Y., Yang, M., Zhang, J., Gao, X., Xu, Y., Li, Y., Zhi, Y., Liu, S., Dong, Q., Zhou, H., & Yeomans, J. C. (2019). Effects of simulated N deposition on photosynthesis and productivity of key plants from different functional groups of alpine meadow on Qinghai-Tibetan Plateau. *Environmental Pollution*, 251, 731–737. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.045>
- Slazak, B., Kaltenböck, K., Steffen, K., Rogala, M., Rodríguez-Rodríguez, P., Nilsson, A., Shariatgorji, R., Andrén, P. E., & Göransson, U. (2021). Cyclotide host-defense tailored for species and environments in violets from the Canary Islands. *Scientific Reports*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91555-y>
- Smith, E. L. (1936). Photosynthesis in Relation to Light and Carbon Dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 22, 504–511. <https://doi.org/10.1073/pnas.22.8.504>
- Steinbauer, M. J., Field, R., Grytnes, J. A., Trigas, P., Ah-Peng, C., Attorre, F., Birks, H. J. B., Borges, P. A. V., Cardoso, P., Chou, C. H., De Sanctis, M., de Sequeira, M. M., Duarte, M. C., Elias, R. B., Fernández-Palacios, J. M., Gabriel, R., Gereau, R. E., Gillespie, R. G., Greimler, J., ... Beierkuhnlein, C. (2016). Topography-driven isolation, speciation and a global increase of endemism with elevation. *Global Ecology and Biogeography*, 25, 1097–1107. <https://doi.org/10.1111/geb.12469>
- Steyn, W. J., Wand, S. J. E., Holcroft, D. M., & Jacobs, G. (2002). Anthocyanins in vegetative tissues: A proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155, 349–361. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x>
- Tejedor, M., Jiménez, C., & Díaz, F. (2003). Volcanic materials as mulches for water conservation. *Geoderma*, 117(3–4), 283–295. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(03\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(03)00129-0)
- Wang, C., Lyu, W., Jiang, L., Wang, S., Wang, Q., Meng, F., & Zhang, L. (2020). Changes in leaf vein traits among vein types of alpine grassland plants on the Tibetan Plateau. *Journal of Mountain Science*, 17(9), 2161–2169. <https://doi.org/10.1007/s11629-020-6069-4>
- Wang, X., Li, Z., Cai, C., Shi, Z., Xu, Q., Fu, Z., & Guo, Z. (2012). Effects of rock fragment cover on hydrological response and soil loss from Regosols in a semi-humid environment in South-West China. *Geomorphology*, 151–152, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2012.02.008>
- Whittaker, R. J., & Fernández-Palacios, J. M. (2007). *Island Biogeography: Ecology, Evolution, and Conservation*. Oxford University Press.
- Wright, I. J., Reich, P. B., Westoby, M., Ackerly, D. D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornellissen, J. H. C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P. K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B. B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., ... Villar, R. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, 428, 821–827. <https://doi.org/10.1038/nature02403>
- Xu, M., Zhang, T., Zhang, Y., Chen, N., Zhu, J., He, Y., Zhao, T., & Yu, G. (2021). Drought limits alpine meadow productivity in northern Tibet. *Agricultural and Forest Meteorology*, 303, 108371. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108371>

- Yockteng, R., Ballard, H. E., Mansion, G., Dajoz, I., & Nadot, S. (2003). Relationships among pansies (*Viola* section *Melanium*) investigated using ITS and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, *241*, 153–170. <https://doi.org/10.1007/s00606-003-0045-7>
- Zeng, D., Galetti, M., Liu, J., Jin, T., Zhao, Y., & Ding, P. (2022). Size-related seed use by rodents on early recruitment of *Quercus serrata* in a subtropical island forest. *Forest Ecology and Management*, *503*, 119752. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119752>
- Zhang, L., Zhang, S., Li, Q., & Quan, C. (2020). Reduced stomatal frequency with rising elevation for *Kobresia royleana* on the Tibetan Plateau. *Global Ecology and Conservation*, *24*, e01326. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01326>