



Revista Cubana de Ciencias Informáticas

ISSN: 1994-1536

ISSN: 2227-1899

Editorial Ediciones Futuro

Quintana, Silverio Andrés; María Grossi, Cecilia Eugenia; Espinoza, Rodrigo; Ulloa, Rita
Plantico, un paquete en R para análisis estadístico de variables biométricas de plantas
Revista Cubana de Ciencias Informáticas, vol. 15, núm. 4, 2021, Octubre-Diciembre, pp. 45-60
Editorial Ediciones Futuro

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=378369433004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEM redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Plantico, un paquete en R para análisis estadístico de variables biométricas de plantas

Plantico, an R statistical analysis package for plant biometric parameters

Silverio Andrés Quintana ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-1877-3795>

Cecilia Eugenia María Grossi² <https://orcid.org/0000-0001-6222-1528>

Rodrigo Espinoza¹ <https://orcid.org/0000-0003-4157-5305>

Rita Ulloa ^{2,3} <https://orcid.org/0000-0002-9355-4621>

¹ Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología. Mcal. José Estigarribia Km. 11, San Lorenzo, Paraguay. squintana@facen.una.py , rodespinosas93@gmail.com

² Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI). Vuelta de obligado 2490, Buenos Aires, Argentina. ceci.grossi@gmail.com , ulloa.rita@gmail.com

³ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina. rulloa@dna.uba.ar

*Autor para la correspondencia. (squintana@facen.una.py)

RESUMEN

Los estreses abióticos y bióticos impactan negativamente en el desarrollo de las plantas afectando diferentes parámetros biométricos (por ejemplo, la longitud del vástago o de la raíz) que pueden medirse a distintos tiempos de aplicado el estrés. Sin embargo, es fundamental realizar un adecuado análisis estadístico de los datos numéricos obtenidos para evaluar el efecto del estrés sobre la planta. Por este motivo, a través del uso del lenguaje R, se creó el paquete denominado “Plantico” que realiza el análisis de la varianza (ANOVA) y somete los datos a la prueba de Tukey. Además, permite obtener las gráficas de barra, de puntos, y diagrama de caja para los “t” días del ensayo. Para validar la utilidad del paquete se determinó la longitud de la raíz de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones control (MS 0,5x) o expuestas a estrés salino (MS 0,5x +75 mM NaCl) u osmótico (MS 0,5x +100 mM manitol) durante 7 días. El análisis estadístico de los datos obtenidos y los gráficos correspondientes se procesaron con Plantico. Esta herramienta puede ser descargada y utilizada de manera gratuita y puede configurarse para incluir otras variables biométricas o diferentes tiempos de estudio. Plantico facilita el análisis estadístico y la visualización de los datos experimentales.

Palabras clave: lenguaje R; Plantico; análisis estadístico; parámetros biométricos.

ABSTRACT

Abiotic and biotic stresses negatively impact on plant development affecting biometric parameters, such as root or shoot length, that can be measured at different time points. An adequate statistical analysis of the data is required to evaluate the effect of each stress condition. Thus, Plantico, an open-source R statistical analysis package that performs the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s test, as well as the bar, line, and box plots at a given “t” time of the assay was created. An assay was conducted with *Arabidopsis* seedlings grown *in vitro* under control (MS 0.5x), saline (MS 0.5X + 75 mM NaCl) or osmotic (MS 0.5 x + 100 mM mannitol) conditions and root length was determined to validate this package. Statistical analysis of the data and the corresponding graphs were performed with Plantico. This tool can be downloaded and used for

free and can be modified to include other biometric parameters and time points. Plantico is a user-friendly package that enables statistical analysis and the visualization of experimental data.

Keywords: R language; Plantico; statistical analysis; biometric parameters.

Recibido: 24/08/2021

Aceptado: 02/10/2021

INTRODUCCIÓN

Las plantas, como organismos sésiles, son capaces de responder a una diversidad de estímulos abióticos y bióticos (Samach y Wigge, 2005; Knudsen y otros, 2018), estas respuestas pueden tener efectos sobre los parámetros morfológicos observables, tales como la longitud de raíz o del vástago (Hanci y Cebeci, 2015; Grossi y otros, 2021), como en parámetros bioquímicos tales como la cuantificación del contenido de clorofila, de ácido ascórbico, prolina y del azúcar soluble total, entre otros (Tripathi y Gautam, 2007; Rahneshan, Nasibi y Moghadam, 2018).

Los datos recolectados u obtenidos en una investigación con plantas deben ser necesariamente analizados estadísticamente e interpretados con criterio técnico y científico. El lenguaje de programación R permite la reproducibilidad en el análisis de datos mediante el uso de funciones dentro de herramientas llamadas paquetes, los cuales son desarrollados por la comunidad (Tippmann, 2015; Vuorre y Crump, 2021). Una función en el lenguaje R es un objeto que contiene tres elementos: un argumento, un cuerpo y un ambiente, y está programado para dar una respuesta de salida basándose en los elementos de entrada que se le otorgue. El argumento es

un conjunto de condiciones de entrada, ya sean datos o parámetros que el usuario necesite procesar. El cuerpo contiene una o más líneas de código que detallan el algoritmo de procesamiento de los datos, utilizando las condiciones provistas en el argumento, y finalmente, el ambiente es el lugar virtual donde se desarrolló la función, y contiene todos los elementos que ésta necesita para operar correctamente (R Core Team, 2017).

Los paquetes pueden encontrarse en distintos repositorios en línea, por lo que son de fácil acceso y pueden ser utilizados de manera gratuita (Salas, 2008). El tipo de licencia del paquete es importante ya que permite la distribución o la utilización de los mismos bajo ciertas condiciones. Las licencias GPL son de código libre y pueden ser utilizadas sin ningún costo (Wolf, Miller y Grodzinsky, 2009), a su vez, las licencias MIT tampoco tienen restricciones, y se puede utilizar o copiar el paquete siempre que se haga mención al mismo en los derechos de autor (Saltzer, 2020).

En el presente trabajo se presenta un paquete del tipo MIT diseñado para el análisis de variables biométricas. Para su validación se llevó a cabo un ensayo con plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas *in vitro* en condiciones control y bajo estrés salino u osmótico, con el fin de recolectar datos de la longitud de la raíz primaria durante una semana y observar cuando se produce una diferencia significativa en el desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo y aplicación del paquete

Diseño del paquete

Para desarrollar el paquete se utilizó el lenguaje de programación R, a través de la interfaz gráfica RStudio (R Core Team, 2021), y se creó una cuenta en el repositorio GitHub (Winnie, 2021). Mediante RStudio se descargó el paquete **roxygen2** para generar los scripts de Plantico así como la descripción del mismo. Este paquete permite realizar el Análisis de Varianza

(ANOVA) y el test de Tukey para comparaciones múltiples de datos experimentales. Los supuestos teóricos de Normalidad y Homocedasticidad se evaluaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente (Parra-Frutos, 2016).

Recolección de datos a partir de plántulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas *in vitro* bajo condiciones control o de estrés abiótico

Se desinfectaron las semillas de *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) con etanol al 70% por 15 minutos y etanol al 96% por 5 minutos y posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril. Luego de vernalizar durante dos días a 4°C, se cultivaron *in vitro* por una semana en el medio de cultivo MS 0,5X con la adición de 0,8% (m/v) de agar (Murashige y Skoog, 1962) con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 21 a 23°C. Se seleccionaron aquellas plántulas que presentaban un crecimiento similar y se establecieron en placas de Petri (Grossi, y otros, 2020). Para el tratamiento control se utilizaron 3 placas con MS 0,5X y para los tratamientos de estrés abiótico se prepararon 4 placas con MS 0,5X conteniendo 75 mM NaCl (salino) o 100 mM manitol (osmótico). Se colocaron 4 plántulas por placa; la medición de la longitud de la raíz primaria de cada plántula fue realizada diariamente durante 7 días tanto a las plantas control como a las tratadas utilizando el software ImageJ (Rueden y Eliceiri, 2019).

Utilización del paquete mediante datos obtenidos del ensayo de estrés abiótico

Los datos obtenidos fueron guardados con el nombre de “DatosTabla” en una tabla en formato Excel, con las columnas Tratamiento, Tiempo y Longitud. Estos fueron posteriormente cargados al ambiente de RStudio. Las columnas Tratamiento y Tiempo fueron importadas como datos de carácter y la columna Longitud como dato numérico. Las funciones del paquete Plantico fueron llamadas de la siguiente manera:

```
>Resumentiempo_t (DatosTabla, t)  
>Tabla_t_A(DatosTabla, t)
```

```
>Tabla_tukey_A(DatosTabla, t)
>Graficadebarratiempo_t(DatosTabla, t)
>Grafico_lineas_tiempo_t(DatosTabla, t)
```

Donde t representa los diferentes tiempos de medición del ensayo experimental con plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró crear el paquete “Plantico”, el cual consta de 5 funciones para obtener los estadísticos descriptivos de los datos del análisis de estrés abiótico en plantas. Estas 5 funciones pudieron ser descargadas junto con Plantico directamente desde el repositorio de GitHub previa descarga del paquete **devtools** (Wickham y otros, 2020). Cuando se instaló Plantico, el paquete importó a otros paquetes que ayudan al análisis de datos tales como **readxl** que hace uso de los datos de Microsoft Excel importados al entorno de R (Wickham y Bryan 2019), **dplyr** (Mailund, 2019) que permite trabajar con datos tabulados de manera sencilla (Wickham, 2021), **psych** que utiliza la función **describeBy** para agrupar los datos por tratamiento y calcular su respectiva media, mediana y otros parámetros (Revelle, 2021). Para poder realizar gráficos el paquete utiliza a **ggplot2** (Wickham 2016). Todos estos paquetes poseen sus respectivas licencias de uso. Los paquetes **devtools** y **psych** tienen licencia GPL \geq 2, **readxl** tiene licencia GPL 3 y los paquetes **ggplot2** y **dplyr** tienen licencia MIT por lo cual se pueden utilizar de manera libre y gratuita. La licencia de Plantico es del tipo MIT, y se escogió este tipo de licencia para que cualquier usuario interesado lo pueda utilizar (Kapitsaki, Kramer y Tselikas, 2017). Cabe destacar que también el lenguaje R está disponible como software libre bajo los términos de licencia GNU (Chen y Peace, 2013) lo cual constituye una ventaja respecto a otros softwares estadísticos que son pagos. Si bien el lenguaje R cuenta con funciones de base que pueden realizar muchos análisis estadísticos, el paquete desarrollado simplifica el análisis de los datos con el uso de pocas funciones que permiten generar gráficos de barras, de líneas y de cajas, sujetos a un tiempo “t”

modificable por el usuario. Todas las funciones generadas requieren dos argumentos para su uso: los datos a ser procesados en forma tabular y el tiempo del que se desea obtener el resultado de la función. Esto último permite que se puedan hacer análisis a lo largo del experimento y no solo en el tiempo final. Posterior al desarrollo e instalación del paquete se realizó la aplicación del mismo usando los datos experimentales del cultivo *in vitro* de plántulas de *Arabidopsis*. En la Figura 1 se observa que las plantas que tuvieron mayor crecimiento de raíces al final del ensayo fueron las de la condición control.

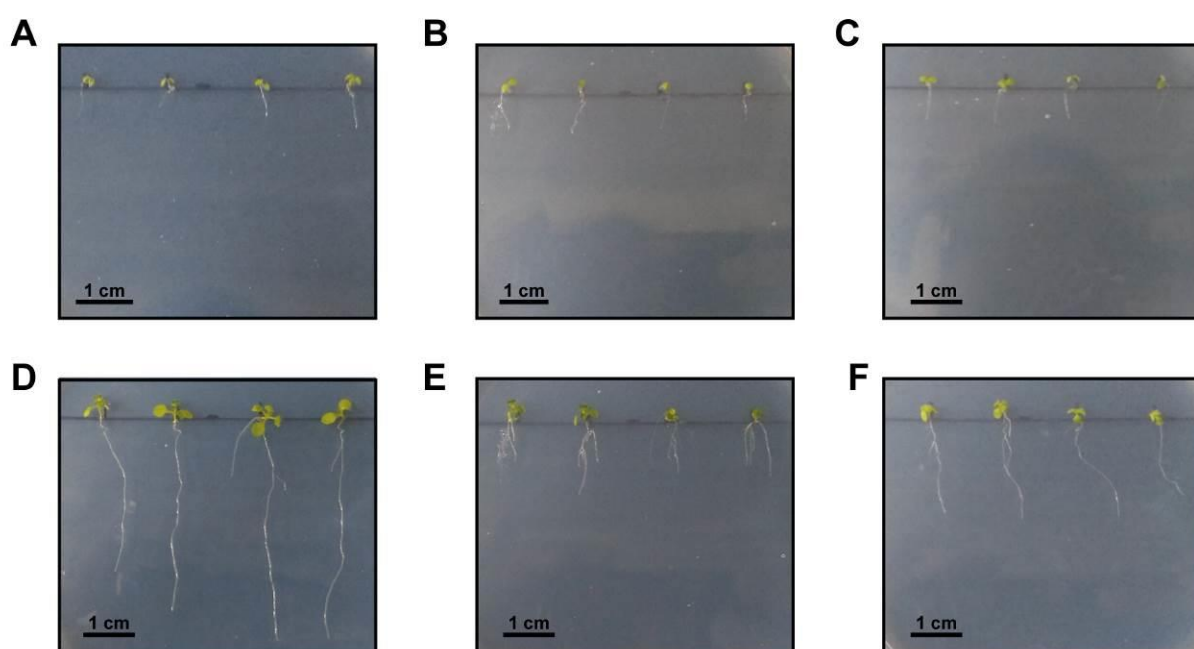


Fig. 1 – Imágenes representativas de plántulas de *A. thaliana* cultivadas en condiciones control (MS 0,5X; A y D) o bajo estrés osmótico (MS 0,5X + 100 mM manitol; B y E) o salino (MS 0,5X con 75 mM NaCl; C y F) a diferentes tiempos: día 1 (A-C), día 7 (D-F) .

Luego de cargar los datos de longitud de raíces en el archivo Excel se los importó al ambiente de RStudio y se usó el paquete Plantico. Para visualizar los datos como un gráfico de líneas con la desviación estándar como sombreado, se utilizó la función `>Grafico_lineas_tiempo_t` capaz de

plasmar los resultados obtenidos a lo largo de 7 días. Como se observa en la Figura 2, en todos los tiempos del ensayo, las plantas que presentaron mayor longitud de raíces fueron las de la condición control, seguido por las condiciones de estrés con NaCl y manitol, respectivamente.

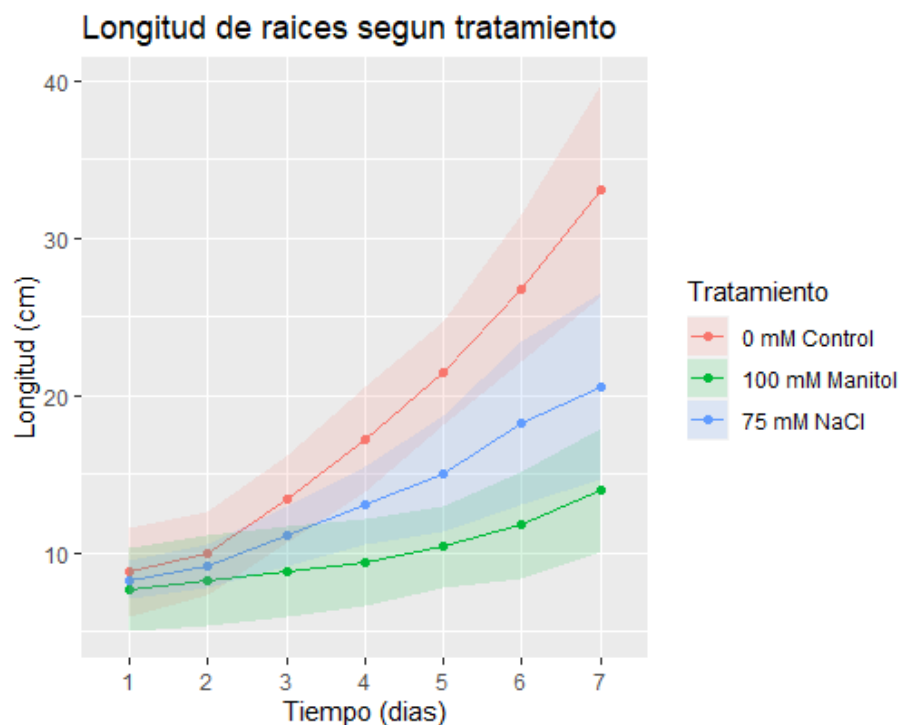


Fig. 2 – Gráfica de líneas correspondiente al ensayo con los distintos tratamientos por el periodo de 7 días.

Para obtener datos resumidos de los estadísticos más comunes se creó la función `Resument tiempo_t`, esta función procesó los datos del tiempo “t” y devolvió la cantidad de variables analizadas (*vars*), la cantidad de muestras por grupo (*n*), la media, la desviación estándar (*sd*), la mediana (*mean*), el valor mínimo (*min*) y máximo (*max*), el rango (*range*), el error estándar (*SE*), la media truncada (*trimmed*), la desviación absoluta media (*mad*) y los coeficientes *skew* y *kurtosis*. Como se observa en la Figura 3 la función ya separa los datos en grupos de acuerdo a los tratamientos del estudio.

```

Descriptive statistics by group
group: 0 mM Control
  vars  n mean  sd median trimmed  mad  min   max range skew kurtosis  se
X1     1 11 8.76 2.84   9.02   8.59 2.46 4.92 14.18  9.26 0.23   -1.12 0.86
-----
group: 100 mM Manitol
  vars  n mean  sd median trimmed  mad  min   max range skew kurtosis  se
X1     1 14 7.66 2.62   8.38   7.86 1.7 0.83 12.1 11.27 -0.95   1.02 0.7
-----
group: 75 mM NaCl
  vars  n mean  sd median trimmed  mad  min   max range skew kurtosis  se
X1     1 15 8.3 1.23   8.12   8.3 1.5 6.46 10.22  3.76 0.17   -1.46 0.32

```

Fig. 3 – Resultados de utilizar la función >Resumentiempo_t para el tiempo 1.

Para realizar un gráfico de barra con desviación estándar, se utilizó la función >Graficadebarratiempo_t. En la Figura 4 se pueden observar los resultados del tiempo 1, sin embargo, también se podría utilizar para el tiempo que el usuario necesite reemplazando por el tiempo t.

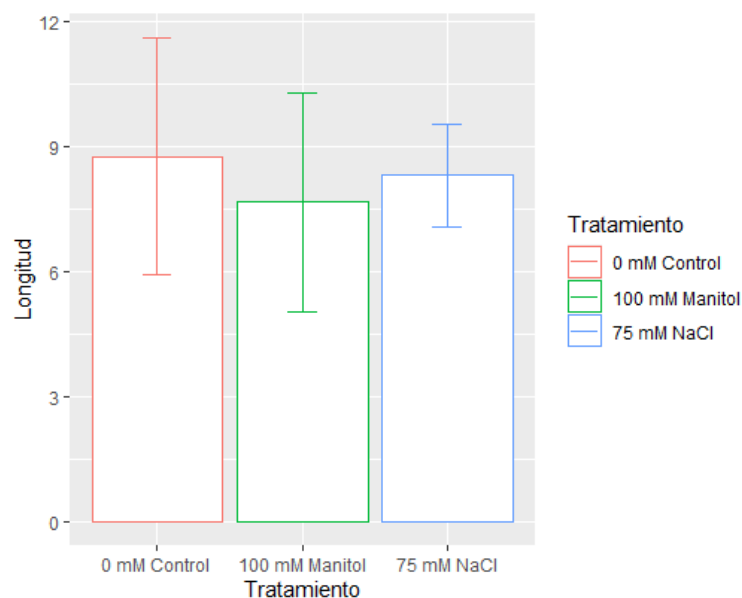


Fig. 4 – Resultados de utilizar la función >Graficadebarratiempo_t para el tiempo 1.

El análisis de varianza de los resultados en cada tiempo puede ser de interés particular, es por ello que se diseñó una función que permita realizar el ANOVA entre tratamientos como se observa en la Figura 5 A. El ANOVA es un método paramétrico que necesariamente requiere el cumplimiento de algunos supuestos teóricos como normalidad y homocedasticidad. Existen diversidad de pruebas para verificar los suposiciones del ANOVA, desde métodos gráficos donde se visualiza el comportamiento de datos hasta métodos formales de contraste, en este caso se utilizó la combinación de las pruebas formales de Shapiro-Wilk y Levene debido a su amplia utilización como métodos de verificación dentro de la comunidad científica, no obstante existen otras combinaciones que podrían tener mayor robustez como la combinación de Shapiro-Wilk seguido por las pruebas de Bartlett y Brown-Forsythe (Parra-Frutos,2016 ; Kozak y Piepho, 2018). A continuación se aplicó el test de Tukey que permite realizar comparaciones múltiples. En la Figura 5B, el análisis de los valores de p indicó que en el tiempo 1 no hay una diferencia significativa entre los tratamientos.

<p>A</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Df</th> <th>Sum Sq</th> <th>Mean Sq</th> <th>F value</th> <th>Pr(>F)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tratamiento</td> <td>2</td> <td>7.69</td> <td>3.845</td> <td>0.743</td> <td>0.483</td> </tr> <tr> <td>Residuals</td> <td>37</td> <td>191.50</td> <td>5.176</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Tratamiento	2	7.69	3.845	0.743	0.483	Residuals	37	191.50	5.176			<p>B Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level</p> <p>Fit: aov(formula = Longitud ~ Tratamiento, data = Tiempo_t)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>\$Tratamiento</th> <th>diff</th> <th>lwr</th> <th>upr</th> <th>p adj</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100 mM Manitol-0 mM Control</td> <td>-1.1005844</td> <td>-3.338506</td> <td>1.137337</td> <td>0.4602755</td> </tr> <tr> <td>75 mM NaCl-0 mM Control</td> <td>-0.4600606</td> <td>-2.664915</td> <td>1.744794</td> <td>0.8672295</td> </tr> <tr> <td>75 mM NaCl-100 mM Manitol</td> <td>0.6405238</td> <td>-1.423547</td> <td>2.704595</td> <td>0.7309494</td> </tr> </tbody> </table>	\$Tratamiento	diff	lwr	upr	p adj	100 mM Manitol-0 mM Control	-1.1005844	-3.338506	1.137337	0.4602755	75 mM NaCl-0 mM Control	-0.4600606	-2.664915	1.744794	0.8672295	75 mM NaCl-100 mM Manitol	0.6405238	-1.423547	2.704595	0.7309494
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)																																		
Tratamiento	2	7.69	3.845	0.743	0.483																																		
Residuals	37	191.50	5.176																																				
\$Tratamiento	diff	lwr	upr	p adj																																			
100 mM Manitol-0 mM Control	-1.1005844	-3.338506	1.137337	0.4602755																																			
75 mM NaCl-0 mM Control	-0.4600606	-2.664915	1.744794	0.8672295																																			
75 mM NaCl-100 mM Manitol	0.6405238	-1.423547	2.704595	0.7309494																																			

Fig. 5 – (A) Resultados de ANOVA mediante uso de la función >Tabla_t_A para el tiempo 1. (B) Resultados del test de Tukey al utilizar la función >Tabla_tukey_A para el tiempo 1.

La función de Plantico que realiza el ANOVA también permite realizar el diagrama de cajas como se visualiza en la Figura 6. Este tipo de diagrama facilita la representación gráfica de la variable cuantitativa (tal como longitud) y distinguir los grupos numéricos a través de cuartiles. Además, se pueden observar los valores mínimos y máximos.

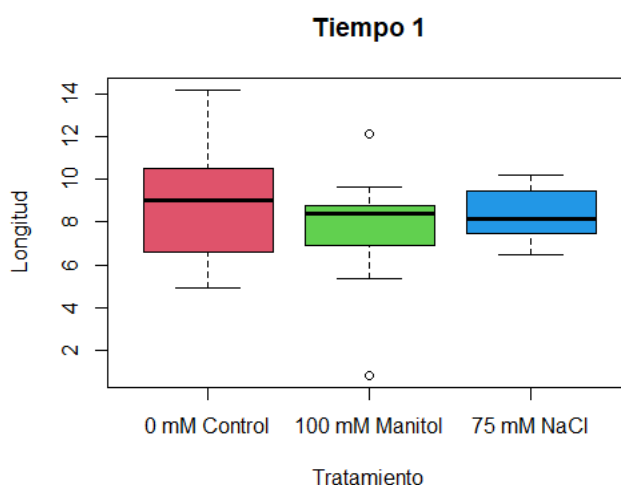


Fig. 6 – Diagrama de cajas obtenido al utilizar la función >Tabla_t_A para el tiempo 1.

Una vez obtenidos los resultados se procedió a copiarlos en un archivo como lo expuesto en la Tabla 1, y se estableció la significancia entre los distintos tratamientos.

Tabla 1 - Resultados obtenidos del análisis de varianza luego de procesar los datos con el paquete Plantico.

Condición	valor p						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Control vs. 100 mM manitol	0,4602	0,1572	0,0001*	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Control vs. 75 mM NaCl	0,8672	0,6516	0,0587	0,0019*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
75 mM NaCl vs. 100 mM manitol	0,7309	0,5223	0,0449*	0,0037*	0,0012*	0,0011*	0,0075*

Se establece que hay diferencia significativa para valores de $p < 0,05$ que son indicados con *.

Este tipo de estudio permite observar los efectos de la sal en las plantas incluyen estrés osmótico y toxicidad de iones (Qi y Zhang, 2020). El desbalance de nutrientes y las deficiencias ocasionan daño en las membranas celulares, disminuyen la expansión, generan cambios en procesos

metabólicos, estrés oxidativo y genotoxicidad. Generalmente, la fase temprana del crecimiento vegetativo de plántulas es más sensible que las fases tardías. El sistema radicular no se desarrolla en forma óptima, es menos profundo, menos ramificado, pesa menos y es menos eficiente en la absorción de agua y nutrientes. Se reportó que el estrés salino disminuye la división celular epidérmica de la raíz y la tasa de alargamiento, reduciendo el crecimiento de raíces primarias e inhibiendo la iniciación lateral (Julkowska y otros, 2017).

Este paquete permitió el análisis estadístico de los datos recopilados a partir de plántulas de *A thaliana* que fueron sometidas a estrés salino y osmótico. Las figuras 3, 4, 5 y 6 corresponden al tiempo 1, momento en el que no se observaron diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, como se observa en las figuras 1 y 2 y en la Tabla 1, se observó un acortamiento significativo ($p < 0,05$) en la longitud de las raíces, a partir del día 3 del ensayo, entre la condición control y tratamiento con manitol y también entre manitol y NaCl. A partir del día 4, también se observan diferencias entre el control y el tratamiento con NaCl. Estas diferencias se mantienen hasta el final del ensayo (día 7). Los datos reportados en este trabajo son concordantes con los de otros autores (Van der Does y otros, 2017; Nath y otros, 2019) y con lo reportado previamente por nuestro grupo (Grossi y otros, 2020).

CONCLUSIONES

Este paquete de uso libre fue desarrollado con el fin de ayudar al análisis estadístico de resultados experimentales. El estrés salino y el estrés osmótico ocasionaron una reducción en la longitud de la raíz primaria y el análisis de los datos con el paquete Plantico permitió identificar el momento a partir del cual las diferencias observables fueron significativas. Plántico podría ser utilizado en otros ensayos de estrés.

REFERENCIAS

- Chen, F. Y peace, K. Applied meta-analysis with r. Boca raton, crc press, 2013, p. 322.
- Julkowska, M.M., Koevoets, I.T., Mol, S., Hoefsloot, H., Feron, R., Tester, M.A., Keurentjes, J.J.B., Korte, A., Haring, M.A., de Boer, G.-J. Y Testerink, C. Genetic components of root architecture remodeling in response to salt stress. The plant cell, 2017. 29(12): p. 3198-3213
- Grossi, C.E.M., Fantino, E., Serral, F., Zawoznik, M.S., Fernandez do Porto, D.A. Y Ulloa, R.m. Methylobacterium sp. 2a is a plant growth-promoting rhizobacteria that has the potential to improve potato crop yield under adverse conditions. Frontiers in plant science, 2020, p. 1-15.
- Grossi, C.E.M., Santin, F., Quintana, S.A., Fantino, E. Y Ulloa, R.M. Calcium-dependent protein kinase 2 plays a positive role in the salt stress response in potato. Plant cell reports, 2021, 40(3): p. 1-14.
- Hanci, F. Y Cebeci, E. Comparison of salinity and drought stress effects on some morphological and physiological parameters in onion (allium cepa l.) During early growth phase. Bulgarian journal of agricultural, 2015, 21(6): p. 1204-1210.
- Kapitsaki, G.M., Kramer, F. Y Tselikas, n.d. Automating the license compatibility process in open source software with spdx. Journal of systems and software, 2017, p. 386-401.
- Knudsen, C., Gallage, N.J., Hansen, C.C., Møller, b.l. Y Laursen, T. Dynamic metabolic solutions to the sessile life style of plants. Natural product reports, 2018, 35(11): p. 1140-1155.
- Kozak, M. Y Piepho, H.-P. What's normal anyway? Residual plots are more telling than significance tests when checking anova assumptions. Journal of agronomy and crop science, 2018, 204(1): p. 86-98
- Mailund, T. Manipulating data frames: dplyr. En: r data science quick reference. New york: apress, 2019. P. 109-155.
- Murashige, T y Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol plant, 1962, p. 473–497.
- Nath, M., Bhatt, D., Jain, A., Saxena, S.C., Saifi, S.K., Yadav, S., Negi, M., Prasad, r. Y Tuteja, N. Salt stress triggers augmented levels of na⁺, ca²⁺ and ros and alter stress-responsive gene

expression in roots of cbl9 and cipk23 knockout mutants of arabidopsis thaliana. Environmental and experimental botany, 2019. P. 265-276.

Qi, F. Y Zhang, F. Cell cycle regulation in the plant response to stress. Frontiers in plant science, 2020. P. 1-10.

Tippmann, S. Programming tools: adventures with r. Nature london, 2015, p 109-110.

Parra-frutos, I. Preliminary tests when comparing means. Computational statistics, 2016, 31(4):p. 1607–1631.

R Core Team. R an introduction to r. [en línea]. R language, 2021. [consultado el: 17 de agosto de 2021] 2-5 p. Disponible en: <https://cran.r-project.org/doc/manuals/r-release/r-intro.pdf>

R Core Team. R language definition (draft). Version 3.4.1. [en línea]. R language, 2017. [consultado el: 17 de mayo de 2021] 25-35 p. Disponible en: http://web.mit.edu/r_v3.4.1/r-lang.pdf

Rahneshan, Z., Nasibi, F. Y Moghadam, A.A. Effects of salinity stress on some growth, physiological, biochemical parameters and nutrients in two pistachio (pistacia vera l.) Rootstocks. Journal of plant interactions, 2018, 1(13): p. 73-82.

Revelle, W. Psych: procedures for psychological, psychometric, and personality research. [en línea]. Package “psych”, 2021. [consultado el: 21 de junio de 2021] 7-19 p. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/psych/psych.pdf>

Rueden, C.T. Y Eliceiri, K.W. Imagej for the next generation of scientific image data. Microscopy and microanalysis, 2019, 25(s2): p. 142-143.

Salas, C. ¿por qué comprar un programa estadístico si existe r?. [en línea]. Ecología austral, 2008. [consultado el: 29 de abril de 2021] 223-231 p. Disponible en: http://ojs.ecologiaaustral.com.ar/index.php/ecologia_austral/article/view/1389

Saltzer, J. The origin of the “mit license”. [en línea]. IEEE annals of the history of computing, 2020, vol. 42, [consultado el: 04 de mayo de 2021] 94-98 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1109/mahc.2020.3020234>

Samach, A. Y Wigge, P. A. Ambient temperature perception in plants. Current opinion in plant biology, 2005, 8(5): p. 483-486.

- Tripathi, A. K., y Gautam, M. Biochemical parameters of plants as indicators of air pollution. *Journal of environmental biology*, 2007, 28(1): p. 127-32.
- Van Der does, D., Boutrot, F., Engelsdorf, T., Rhodes, J., Mckenna, J.F., Vernhettes, S., Koevoets, I., Tintor, N., Veerabagu, M., Miedes, E., Segonzac, C., Roux, M., Breda, A.S., Hardtke, C.S., Molina, A., Rep, M., Testerink, C., Mouille, G., Höfte, H., Hamann, T. y Zipfel, c. The arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase mik2/lrr-kiss connects cell wall integrity sensing, root growth and response to abiotic and biotic stresses. *Plos genetics*, 2017, 13(6): p. 1-27
- Vuorre, M. Y Crump, M.J.C. Sharing and organizing research products as r packages. *Behavior research methods*, 2021, 53(2): p. 792-802.
- Wickham, H. Programming with ggplot2. En: *springer. Ggplot2*. 2016. P. 241-253.
- Wickham, H. Y Bryan, J. Readxl: read excel files. [en línea]. Package “readxl”, 2019. [consultado el: 17 de mayo de 2021] 1-9 p. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/readxl/readxl.pdf>
- Wickham, H.; François, R.; Henry, L.; Müller, K. Dplyr: a grammar of data manipulation. [en línea]. Package “readxl”, 2021. [consultado el: 16 de junio de 2021] 3-12 p. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/dplyr/dplyr.pdf>
- Wickham, H.; Hester, J.; Chang, W. Devtools: tools to make developing r packages easier. 2021. [en línea]. Package “devtools”, 2021. [consultado el: 14 de junio de 2021], 25-29 p. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/devtools/devtools.pdf>
- Winnie, D. Setting up github. Berkeley, essential java for ap compsci, 2021, p. 9-11.
- Wolf, M.J.; Miller, K.W.; grodzinsky, f.s. On the meaning of free software. *Ethics and information technology*, 2009, p. 279-286.

Conflicto de interés

Los autores del presente trabajo no poseen conflicto de interés, se autoriza la distribución y uso del presente artículo.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Silverio Andrés Quintana y Cecilia Eugenia María Grossi.

Curación de datos: Silverio Andrés Quintana y Rodrigo Espinoza

Análisis formal: Silverio Andrés Quintana, Rodrigo Espinoza y Rita Ulloa

Adquisición de fondos: Silverio Andrés Quintana y Rita Ulloa

Investigación: Cecilia Eugenia María Grossi

Metodología: Silverio Andrés Quintana, Rodrigo Espinoza, Rita Ulloa

Administración del proyecto: Silverio Andrés Quintana y Rita Ulloa

Recursos: Silverio Andrés Quintana y Rita Ulloa

Software: Silverio Andrés Quintana y Rodrigo Espinoza

Supervisión: Rita Ulloa

Validación: Silverio Andrés Quintana y Cecilia Eugenia María Grossi

Visualización: Silverio Andrés Quintana, Rodrigo Espinoza y Cecilia Eugenia María Grossi

Redacción – borrador original: Silverio Andrés Quintana, Rodrigo Espinoza y Cecilia Eugenia María Grossi

Redacción – revisión y edición: Silverio Andrés Quintana, Cecilia Eugenia María Grossi y Rita Ulloa