
DINÁMICA DE CRECIMIENTO CELULAR DE *Beta vulgaris* L.

CULTIVADA *IN VITRO* MEDIANTE ANÁLISIS DIGITAL DE

IMÁGENES Y DE LA DIMENSIÓN FRACTAL

Lino Sánchez Segura, José Jorge Chanona Pérez, Roberto Campos Mendiola, Martha L. Arenas Ocampo y Antonio R. Jiménez-Aparicio

RESUMEN

En los cultivos de células vegetales en suspensión, la morfología de los agregados celulares puede tener relación con el estado metabólico y la viabilidad celular. Estos agregados tienen formas irregulares que van cambiando durante el crecimiento. En años recientes se ha empleado el análisis digital de imágenes (ADI) para caracterizar objetos irregulares, en donde se aplican descriptores de irregularidad, como el factor de compacidad. También, el grado de irregularidad de un objeto puede ser valorado objetivamente con la aplicación de conceptos como el de la geometría fractal. En este trabajo se estudió la dinámica de crecimiento de un cultivo de células de *Beta vulgaris* L., (*Chenopodiaceae*). Se determinaron los cambios de

tamaño y forma de los agregados celulares cada 24h durante 31 días. Estas mediciones se realizaron obteniendo imágenes digitales de los agregados en intervalos de tiempo de 24h. Posteriormente, se aplicó ADI para obtener área, perímetro y factor de compacidad, y se determinó la dimensión fractal de los agregados. Con los valores de dimensión fractal, se analizó la dinámica de crecimiento de los agregados mediante el desfase de tiempo por el diagrama de fases de Poincaré, lo que permitió visualizar dos etapas de la dinámica de crecimiento. Una etapa de crecimiento periódico y otra de crecimiento caótico de los agregados celulares.

Introducción

El cultivo *in vitro* de células de *Beta vulgaris* L. para la producción de pigmentos (betaninas), puede ser una tecnología de utilidad en la industria alimentaria (Trejo-Tapia *et al.*, 2007). Estos cultivos se caracterizan por la proliferación de células indiferenciadas que forman agregados llamados callos (Pépin *et al.*, 1999). Estos agregados aumentan de tamaño y cambian de forma a lo largo del tiempo de cultivo. La producción y acumulación de betaninas dentro de los agregados puede estar relacionado con el tamaño y la forma de los agregados (Jiménez *et al.*, 2005). Por lo tanto, la predicción del tamaño y la forma de los agregados puede servir como parámetro de control en

cultivos celulares de mayor escala (Pépin *et al.*, 1999; Edahiro y Seki, 2006). Además, en cultivos con agitación, el tamaño y la forma de los agregados puede afectar las características reológicas (Jiménez-Aparicio *et al.*, 1996).

En años recientes se ha venido empleando el análisis digital de imágenes (ADI) para cuantificar características morfológicas y estructurales en materiales biológicos (Pépin *et al.*, 1999; Berzin *et al.*, 2000), y ha sido utilizado para caracterizar la forma de agregados celulares de *Solanum chysotrichum* (Trejo-Tapia *et al.*, 2001).

Con la aplicación de ADI se obtienen algunos parámetros que sirven para caracterizar el tamaño de los agregados celulares, como lo son las mediciones de área y perímetro (Trejo-

Tapia *et al.*, 2007). Otros parámetros caracterizan la forma, como es el caso del factor de compacidad, cuyo valor es >12 para objetos irregulares, porque la irregularidad del perímetro es mayor al área correspondiente (Jiménez-Martínez *et al.*, 2009). Por otra parte, se pueden usar los valores de área y perímetro para obtener la dimensión fractal (DF) de los agregados. La DF no sólo es un parámetro de irregularidad, sino que sus valores son independientes del tamaño del objeto, por lo cual caracteriza mejor su irregularidad (Katz, 1988; Smith y Behar, 1994; Milosevic y Ristanović, 2009). En años recientes, algunos autores han determinado valores de DF de agregados celulares en cultivo apoyándose en herramientas de ADI. Logan y

Wilkinson (1991) describieron el comportamiento fractal de agregados de *Zooglea ramigera* y *Saccharomyces cerevisiae*. Jiménez *et al.* (2005) determinaron la naturaleza fractal de células de *B. vulgaris* sometidas a permeabilización. Los autores midieron la dimensión fractal de los agregados de *B. vulgaris* crecidos en suspensión a través de la dimensión fractal de área (D_A) y perímetro (D_P). Esto les permitió establecer una relación entre la concentración de biomasa y el tamaño de los agregados crecidos tanto en matraces como en biorreactores.

Otra característica interesante de la teoría fractal es su relación con las teorías del caos y de la dinámica no lineal (Grassberger y Procaccia, 1983; Johnson y Moon, 1999), es de-

PALABRAS CLAVE / Análisis Digital de Imágenes / Atractor / *Beta vulgaris* / Caos / Crecimiento / Cultivo de Células Vegetales / Dimensión Fractal / Maduración /

Recibido: 23/12/2009. Modificado: 07/04/2011. Aceptado: 11/04/2011.

Lino Sánchez Segura. Maestro en Ciencias, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Instituto Politécnico Nacional (IPN). Estudiante de Doctorado, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB)-IPN.

José Jorge Chanona Pérez. Doctor en Ciencias, ENCB-IPN, México. Investigador, ENCB-IPN, México.

Roberto Campos Mendiola. Doctor en Ciencias, ENCB-IPN, México. Investigador, CeProBi-IPN, México.

Martha Lucía Arenas Ocampo. Doctora en Ciencias, CEPROBI-IPN, México. Investigadora, CEPROBI-IPN, México.

Antonio Ruperto Jiménez-Aparicio. Doctor en Ciencias, ENCB-IPN, México. Investigador, CEPROBI-IPN, México.

Dirección: Apartado Postal 24. Yautepec, Morelos, México. C.P.62731. e-mail: aaparicio@ipn.mx

CELL DYNAMICS GROWTH IN *Beta vulgaris* L. CULTURE *IN VITRO* USING DIGITAL IMAGE ANALYSIS AND FRACTAL DIMENSION

Lino Sánchez Segura, José Jorge Chanona Pérez, Roberto Campos Mendiola, Martha L. Arenas Ocampo and Antonio R. Jiménez-Aparicio

SUMMARY

In vitro cell culture, the morphology of cellular aggregates is related to metabolic state and cellular viability. These aggregates display irregular shapes that change during growth. In recent years, digital image analysis (DIA) has been used to characterize irregular objects applying irregularity descriptors, such as the compactness factor. Likewise, the irregularity of an object may also be measured with the application of fractal geometry. In this study, the growth dynamics of *Beta vulgaris* L. (*Chenopodiaceae*) cells was analyzed. Chan-

ges in size and shape of cellular aggregates were measured at 24h intervals during 31 days. These measurements were made using digital images of cellular aggregates taken at intervals of 24h. DIA was later applied to obtain area, perimeter, and compactness factor. Subsequently, the fractal dimension of the aggregates was used to analyze their growth dynamics by time lag utilizing the Poincaré phase diagram. The growth dynamics of the aggregates showed two stages of cellular growth, a periodic one and a chaotic one.

DINÂMICA DE CRESCIMENTO CELULAR DE *Beta vulgaris* L. CULTIVADA *IN VITRO* MEDIANTE ANÁLISE DIGITAL DE IMAGENS E DA DIMENSÃO FRACTAL

Lino Sánchez Segura, José Jorge Chanona Pérez, Roberto Campos Mendiola, Martha L. Arenas Ocampo e Antonio R. Jiménez-Aparicio

RESUMO

Nos cultivos de células vegetais em suspensão, a morfologia dos agregados celulares pode ter relação com o estado metabólico e a viabilidade celular. Estes agregados têm formas irregulares que vão mudando durante o crescimento. Em anos recentes tem sido empregada a análise digital de imagens (ADI) para caracterizar objetos irregulares, aonde se aplicam descritores de irregularidade, como o fator de compacidade. Também, o grau de irregularidade de um objeto pode ser valorizado objetivamente com a aplicação de conceitos como o da geometria fractal. Neste trabalho se estudou a dinâmica de crescimento de um cultivo de células de *Beta vulgaris* L., (*Chenopodiaceae*).

Determinaram-se as mudanças de tamanho e forma dos agregados celulares cada 24h durante 31 dias. Estas medições se realizaram obtendo imagens digitais dos agregados em intervalos de tempo de 24h. Posteriormente, se aplicou ADI para obter área, perímetro e fator de compacidade, e foi determinada a dimensão fractal dos agregados. Com os valores de dimensão fractal, foi analisada a dinâmica de crescimento dos agregados mediante o desfase de tempo pelo diagrama de fases de Poincaré, o que permitiu visualizar duas etapas da dinâmica de crescimento. Uma etapa de crescimento periódico e outra de crescimento caótico dos agregados celulares.

cir, cuando el comportamiento dinámico no es predecible con una ecuación lineal. Esto se debe a que el fenómeno en estudio es afectado por más de un factor. Algunos autores, como Johnson y Moon (1999), consideran que la mayoría de los fenómenos naturales tienen un comportamiento no lineal y en ocasiones su dinámica se vuelve prácticamente impredecible a mediano y largo plazo, comportamiento al que se le denomina caótico.

Sin embargo, en algunos casos, durante la evolución de un fenómeno puede presentarse un comportamiento periódico, por lo que la evolución del fenómeno será relativamente predecible a corto plazo (Mandelbrot, 2003). En el comportamiento periódico, la variable de respuesta oscila dentro de un intervalo estrecho de posibles resultados. A este intervalo se le conoce como 'atractor' du-

rante la dinámica no lineal. También existen otros tipos de atractores que no son periódicos, y por ello no son fácilmente detectados. Estos atractores son denominados 'extraños', y pueden ser detectados y caracterizados con la ayuda de técnicas de análisis matemático para sistemas caóticos (Jonson y Moon, 1998).

En los cultivos celulares deben existir simultáneamente distintos estados celulares, células jóvenes, en división, no viables, en fase apoptótica e incluso muertas (Cosgrove, 2000), por lo que se les puede considerar sistemas asíncronos y complejos. Sin embargo, dentro de ese caos aparente puede existir un probable patrón de crecimiento ordenado (Chakraborti, 2003). Este trabajo se propone describir el desarrollo de la formación de agregados celulares de *Beta vulgaris* L. cultivadas *in vitro*,

aplicando conceptos de dinámica no lineal y utilizando métodos de análisis digital de imágenes.

Materiales y Métodos

Materiales

Se utilizaron células indiferenciadas (callos) de *Beta vulgaris* L. (familia *Chenopodiaceae*), variedad *Crossby Egyptian*. Las células fueron cultivadas en el medio basal B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) de Sigma (St. Louis, MO, EEUU), adicionado con sacarosa (Merck; 20g·l⁻¹); ácido 2,4-diclorofenoxiacético (9,05×10⁻²μmol·l⁻¹), y cinetina (9,05×10⁻²μmol·l⁻¹) Sigma. El pH se le ajustó a 5,5 con NaOH 0,1M y posteriormente se agregó fitagel (2g·l⁻¹). El medio preparado se esterilizó en autoclave durante 20min a una presión de 1,2kg·cm⁻² y se vertió en

cajas de Petri desechables de 150×25mm.

Condiciones de crecimiento de los cultivos

En condiciones de esterilidad se preparó un lote experimental de 15 cajas de Petri desechables con cuatro agregados en cada caja, para trabajar un total de 60 agregados. A cada caja se adicionó 60ml de medio semisólido B₅. Cada cultivo se incubó durante 31 días en una cámara a 25 ±3°C, con fotoperiodo de 16h de luz e intensidad luminosa de 140μmol fotones·m⁻² s⁻¹ (Jiménez-Aparicio *et al.*, 1996).

Adquisición de imágenes de los agregados celulares

La captura de imágenes de los agregados se realizó en cada caja de Petri sin abrirla, y para ello se empleó un sistema com-

puesto por una cámara digital CCD de 2,1 megapíxeles de resolución (Nikon, Coolpix E900; Japón) soportada por un trípode fotográfico con iluminación de 2 focos de 100W de luz blanca. La cámara se enfocó manualmente manteniendo fija la distancia entre el lente y la caja de Petri. Se obtuvo una imagen de cada agregado (60 imágenes por día). Este número de imágenes permite mantener el error estándar por abajo del 5% (Jiménez *et al.*, 2005). Las imágenes fueron adquiridas en color RGB, tamaño de 680×480 píxeles y formato BMP.

Procesamiento de imágenes, ADI y DF

Las imágenes se transformaron a escala de grises (8 bits), y se contrastaron modificando el brillo y contraste mediante el programa Corel Photo Paint (V11.0; Corel Corporation, EEUU). Las imágenes contrastadas de los agregados se binarizaron (área de agregado en negro con entorno blanco). Sobre los objetos binarizados se realizó el ADI, que consistió en la medición de área (A); perímetro (P); diámetro de Feret (F), que es el diámetro calculado igualando el área del objeto con el área de un círculo; y factor de compactidad (Fc) que es un parámetro de irregularidad definido por $P^2 \times A^{-1}$. Para estas mediciones se empleó Sigma Scan Pro (V5.0, SPSS, EEUU). Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente con Excel (Microsoft Corporation, EEUU)

La complejidad de las formas de los agregados fue caracterizada utilizando: a) dimensión fractal de área (D_A), obtenida con la pendiente del gráfico del logaritmo natural del área de cada uno de los agregados vs el logaritmo de la longitud del eje mayor; b) dimensión fractal de perímetro (D_p), que se obtiene como la pendiente resultante del logaritmo natural del área vs el logaritmo del perímetro de cada agregado (Kenkel y Walker, 1996; Katz, 1988).

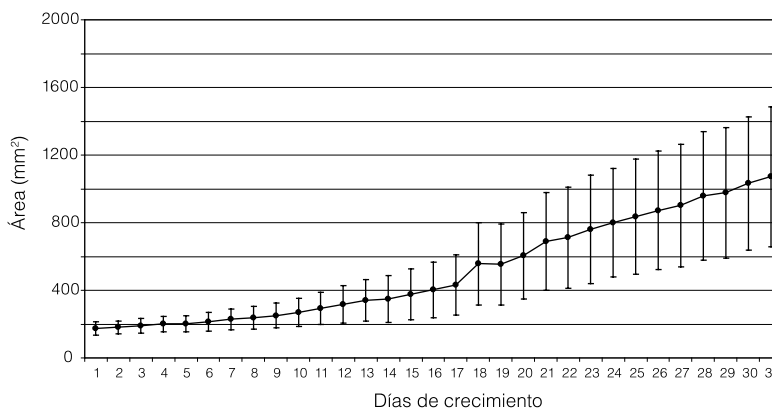


Figura 1. Aumento de tamaño (área en mm²) de los agregados de *Beta vulgaris* L. durante de 31 días de cultivo.

Dinámica no lineal del crecimiento de agregados de *B. vulgaris*

Los cambios de forma de los agregados de *B. vulgaris* fueron medidos a lo largo de 31 días. Las formas de los agregados se caracterizaron utilizando los valores de D_A y D_p . Para analizar la dinámica de los cambios de forma durante los 31 días del experimento, se aplicó un sistema matemático que consiste en el desfase del tiempo, que sirve para diferenciar intervalos de cambios estables e intervalos caóticos. Si durante la dinámica de crecimiento los valores graficados de D_A y D_p muestran periodicidad y ocurren alrededor de un patrón definido, es decir, tienen un atractor, se puede considerar un intervalo cuasi-estable. Si, por otra parte, estos valores de D_A y D_p no muestran ningún comportamiento periódico, se puede considerar un intervalo

caótico. En este sistema matemático, primero se graficó D_A vs t en donde, a cada tiempo t le corresponde un valor D_A . Después, se desfásó el tiempo en un día usando los mismos valores de D_A , y se graficó D_A vs t-1, donde t-1 es el tiempo t menos un día, o tiempo desfásado. Las dos graficas, D_A vs t y D_A vs t-1, se sobrepone en el mismo cuadro gráfico y de esta manera se muestran más evidentes las regiones periódicas y las regiones caóticas durante el crecimiento de los agregados (Johnson *et al.*, 1999).

Resultados y Discusión

El tamaño de los agregados de *Beta vulgaris* L. en cultivo se incrementó a lo largo de todo el intervalo de tiempo que se estudio (31 días), al término del cual los agregados incrementaron su tamaño en promedio casi tres veces respecto a los agregados del tiempo cero. En la Figura 1 se muestra el aumento del área de los agregados durante 31 días de culti-

vo y la variación de tamaños correspondiente a cada día. Se puede observar que la variabilidad de los tamaños aumenta al aumentar el tamaño de los agregados. Además del incremento de tamaño, se observó una amplia variedad de formas, lo que se debió probablemente a la multiplicación de células en forma agregada (sin orden aparente). Como las células son indiferenciadas la duplicación no sigue una orientación coherente, como sucede en el caso de la formación de tejidos. Como resultado,

los agregados tienen formas irregulares (Trejo-Tapia *et al.*, 2003). La medición del factor de compactidad (Fc) proporciona una medida de irregularidad de los agregados. Cuando el agregado se vuelve más irregular, el perímetro es mayor que el área. En la Tabla I se presentan algunos resultados del área y su factor de compactidad correspondiente, observándose un aumento de irregularidad de los agregados hasta el final de la cinética (31 días). Los valores de compactidad indican que tan compactos fueron los agregados como una relación del perímetro entre el área (Sánchez y Bribiesca, 2003). Cuando el agregado es más compacto, Fc es cercano a 12, pero cuando el agregado es irregular Fc es >12.

La relación perímetro / diámetro de Feret también proporciona un referente acerca de la compactación de los agregados. Se puede observar que con el paso del tiempo los agregados pierden compactación y se

TABLA I
ÁREA, FACTOR DE COMPACTIDAD Y RELACIÓN PERÍMETRO ENTRE DIÁMETRO DE FERET DE LOS AGREGADOS DE *B. vulgaris* L. TRAS DIFERENTES PERIODOS DE CRECIMIENTO

Días de crecimiento	Área (mm ²) (X ±DE)	Factor de compactación (X ±DE)	Perímetro / Diámetro Feret
1	174,6 ±38,6	23,4 ±4,1	4,28
6	213,7 ±53,7	22,3 ±3,3	4,19
11	293,2 ±96,1	22,3 ±4,0	4,2
16	403,1 ±164,9	23,1 ±3,6	4,2
21	689,9 ±288,7	26,3 ±6,3	4,5
26	873,1 ±350,2	26,5 ±4,6	4,6
31	1071,7 ±412,3	27,8 ±5,3	5,6

X: media, DE: desviación estándar de 60 mediciones por día.

vuelven irregulares, por lo que el perímetro es mucho mayor que su diámetro. Cabe señalar que los datos mostrados en la Tabla I son los promedios de 61 imágenes de agregados celulares que se obtuvieron para cada día, por lo que se considera que el número de observaciones es una muestra representativa de una población con distribución normal. La irregularidad de los agregados puede atribuirse principalmente a la expansión celular. Esta característica ya ha sido descrita para células vegetales. Algunos autores (Bidwell, 1979; Leboeuf *et al.*, 2004) consideran que la duplicación celular tiende a formar extensiones relativamente alargadas en el agregado y entre cada extensión se generan espacios vacíos. Posteriormente, la duplicación celular llena los espacios vacíos. A esta característica, se le conoce como 'expansión'.

Las formas irregulares de los agregados fueron analizadas como objetos complejos, determinando su dimensión fractal de área D_A y de perímetro D_p . En la Figura 2 se presentan algunos contornos de agregados y sus correspondientes valores de D_A y D_p para diferentes días de crecimiento. Se puede apreciar que cuando el agregado es más rugoso o sinuoso tiene valores mayores de D_p , mientras D_A caracteriza la irregularidad global de la forma del agregado. En la Figura 2, se observa que con el tiempo la forma de los agregados se vuelve más irregular hasta formar extensiones alargadas y los valores de D_A son mayores.

Análisis del crecimiento de los agregados de *B. vulgaris* como dinámica no lineal

Los datos de D_A y D_p de los agregados de *B.*

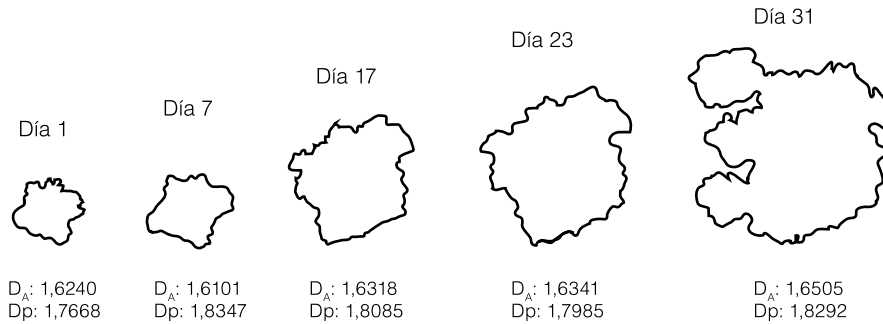


Figura 2. Contorno de la forma y dimensión fractal (D_A y D_p) de agregados de *Beta vulgaris* L. cultivados durante 31 días.

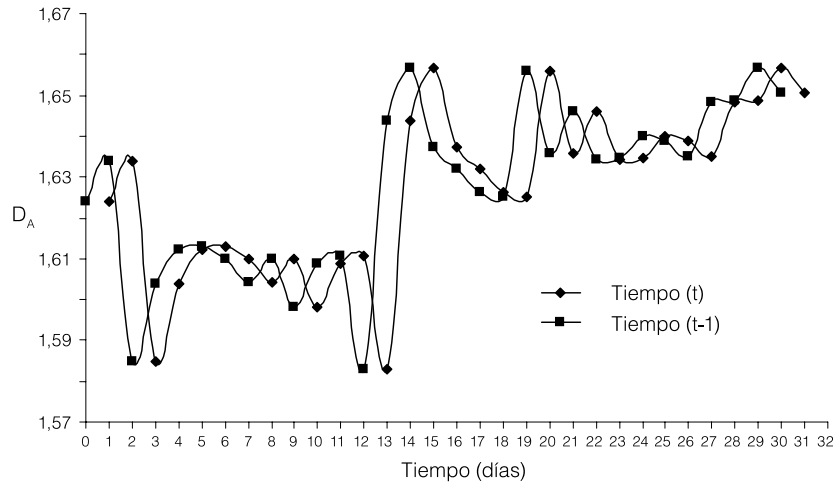


Figura 3. Cinética de D_A desfasada en el tiempo durante el crecimiento de agregados de *Beta vulgaris* L.

vulgaris correspondientes a cada día del cultivo se graficaron respecto al tiempo (D_A vs t ; donde t es el tiempo de crecimiento de los agregados, en días). Adicionalmente se graficó D_A vs $t-1$ (donde $t-1$ es el tiempo desfasado en días). Las grá-

ficas D_A vs t y D_A vs $t-1$ se presentan en la Figura 3, donde D_A tiene comportamiento irregular en distintos intervalos de la cinética de crecimiento, pero también presenta regiones estables (periódicas) en dos intervalos de tiempo: del día 3 al 11

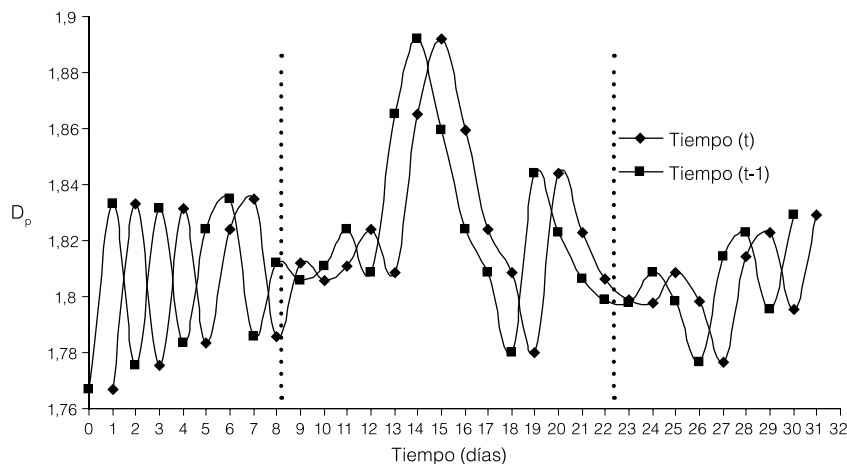


Figura 4. Cinética de D_p desfasada en el tiempo durante el crecimiento de agregados de *Beta vulgaris* L. Se identifican al menos tres regiones en la dinámica no lineal del crecimiento de los agregados, a: intervalo estable o periódico, b: intervalo caótico, y c: intervalo cuasi-caótico.

y del día 21 al 26. Esta característica también se observa en la dinámica de D_p vs t y D_p vs $t-1$. En la Figura 4, se observa que los valores D_p el tiempo y en el tiempo desfasado, tienen intervalos estables e intervalos caóticos con un patrón similar al de la Figura 3.

De acuerdo a lo mostrado en la Figura 4 se pueden distinguir tres regiones de cambios de forma durante el crecimiento de los agregados: un intervalo estable hasta el día 8, después un intervalo caótico desde el día 9 hasta el día 22, y al final un intervalo cuasi-caótico desde el día 22 hasta el 31.

En el intervalo estable es posible que los agregados cambien de una forma relativamente lisa a otra irregular y nuevamente a lisa. Las formas irregulares se pueden deber a la multiplicación celular formando extensiones radiales dejando espacios vacíos entre las extensiones. Después, las nuevas divisiones celulares llenarían los espacios vacíos, y el agregado tendría una superficie más lisa. A esta característica se le conoce como 'expansión' (Leboeuf *et al.*, 2004).

Después, en el intervalo caótico (día 9 al 22 en la Figura 4), se muestran valores altos y bajos de D_p sin un patrón de orden aparente. En este caso, la división celular del agregado no parece tener un mecanismo de control o regulación. También, se pueden observar en este intervalo los valores más altos de irregularidad perimetral ($D_p=1,798$; perímetro sinuoso).

Finalmente, en un tercer intervalo (desde el día 22 hasta el día 31) se observó un relativo regreso al comportamiento oscilatorio, donde se presentó un *cuasi* atractor que reduce el espacio de variaciones de D_p . Se es-

pera que al mantener por más tiempo esta cinética, ocurra un comportamiento similar a este intervalo, si se mantienen las condiciones de cultivo. Es posible que este comportamiento se deba a la formación de células nuevas que tienden a ser más diferenciadas y tienden a formar tejidos de raíz, tallo u hoja.

El comportamiento oscilatorio en el crecimiento de células ha sido referido por Cosgrove (2000), quien lo atribuye a los diferentes cambios en el medio ambiente de la pared celular, tales como potencial redox, pH y especies reactivas de O₂ (ERO's). Sin embargo, de acuerdo a la bibliografía disponible, estos cambios oscilatorios no habían sido cuantificados, particularmente aplicando el concepto de fractalidad y de dinámica no lineal, por lo que ambos aspectos resultan ser un aporte original.

La determinación de la dimensión fractal permite asignar un valor numérico a objetos complejos, como es el caso de los agregados celulares. Se considera que esta medición tiene mayor consistencia porque puede caracterizar estructuras complejas independientemente de su tamaño o de la forma aparente, a diferencia de las mediciones que realizan otros descriptores como es el caso del factor de forma, el factor elíptico, etc.

A su vez, la medición del perímetro y el área está influenciada por el método de observación y medición del objeto, por lo que puede establecer una medición ajustada a un objeto de dimensiones regulares y cuya forma es ideal, es decir, parecido a figuras geométricas euclidianas imposibles de concebir en el crecimiento de un agregado celular.

El desfase del tiempo (Figura 4) permitió evidenciar los intervalos en los que la dinámica de crecimiento ocurría, es decir, los puntos extremos en que fluctuaban los procesos celulares del agregado. De esta manera, el intervalo de crecimiento de los agregados que produjo menos cambios muestra una dinami-

ca de comportamiento estable, en donde es posible establecer patrones celulares de división y crecimiento. Por el contrario, cuando el intervalo de fluctuación de las mediciones de la D_A o D_P es amplio, el sistema impide por su propia naturaleza ser predecible, es decir, tiene un comportamiento caótico. En este caso, los procesos celulares de crecimiento son asíncronos.

Conclusiones

Los cultivos de *Beta vulgaris* L. mostraron un aumento de tamaño de los agregados durante 31 días. El aumento de tamaño pudo determinarse con ADI y sus medidores de área y perímetro. Durante este crecimiento, la forma de los agregados fue cambiando en el tiempo. En general, los agregados tienen formas irregulares, lo cual fue mostrado por el factor de compacidad. Las diferentes formas también fueron caracterizadas con la dimensión fractal de área (D_A) y perímetro (D_P). Los valores de D_A y D_P obtenidos durante el crecimiento sugirieron cambios de tamaño y forma con una dinámica no lineal. Este comportamiento puede ser originado por procesos de expansión y extensión de los agregados. Fue posible establecer tres intervalos en la dinámica de crecimiento y cambios de forma: a) un intervalo estable o periódico; b) un intervalo caótico o de crecimiento desordenado; y c) un intervalo cuasi-periódico. La primera etapa muestra la existencia de un atractor. Es posible que en esta etapa la multiplicación celular y el aumento de volumen celular se den en forma sincronizada. De esta manera, el análisis de la dinámica de crecimiento utilizando el diagrama de desfase del tiempo permitió evidenciar las etapas sincronizadas de crecimiento y las etapas de crecimiento desorganizado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte de los Proyectos CONACYT 39562 y SIP-IPN 20060394.

REFERENCIAS

- Berzin I, Cohen B, Mills D, Dinstein I, Merchuk JC (2000) RhizoScan: A semiautomatic image processing system for characterization of the morphology and secondary metabolite concentration in hairy root cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 70: 17-24.
- Bidwell RGS (1979) *Plant Physiology*. Macmillan. Londres, RU. 784 pp.
- Chakraborti RK, Gardner KH, Atkinson JF, Van Benschoten JE (2003) Changes in fractal dimension during aggregation. *Water Res.* 37: 873-883.
- Cosgrove JD (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 109-124.
- Edahiro JE, Seki M (2006) Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. *J. Biosci. Bioeng.* 102: 8-13.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Grassberger P, Procaccia I (1983) Characterization of strange attractors. *Phys. Rev. Lett.* 50: 346-349.
- Jiménez-Aparicio A, Gutiérrez-López GF, Rodríguez-Monroy M (1996) Caracterización reológica e hidrodinámica del cultivo de células de betabel (*B. vulgaris* L.) productoras de betalainas en un biorreactor tipo tanque agitado. En Hübinger M, Murr F, Aguilera JM (Eds.) *Propiedades Físicas de los Alimentos*. Tomo I. Universidad Politécnica de Valencia. España. pp:105-112.
- Jiménez JC, Salcedo MG, Martínez BB, Chanona PJ, Alamilla BL, Arenas OM, Gutiérrez LG, Jiménez AR (2005) Naturaleza fractal de células en suspensión de *Beta vulgaris* L., sometidas a un proceso de permeabilización. *Biótica* 2: 39-53.
- Jiménez-Martínez C, Campos-Mendiola R, Sánchez-Espíndola ME, Jiménez-Aparicio AR, Gutiérrez-López G, Davila-Ortiz G (2009) Microstructural changes in *Lupinus campestris* seed in response to three thermal debittering treatments. *J. Sci. Food Agric.* 89: 2399-2404.
- Johnson MA, Moon FC (1999) Experimental characterization of quasiperiodicity and chaos in a mechanical system with delay. *Int. J. Bifurc. Chaos* 9: 49-65.
- Kats MJ (1988) Fractals and the analysis of waveforms. *Comput. Biol. Med.* 18: 145-156.
- Kenkel NC, Walker DJ (1996) *Fractals in the Biological Sciences*. www.umanitoba.ca/faculties/sciences/botany/labs/ecology/fractals/fractal.html (Cons. 02/07/2003).
- Leboeuf E, Thoiron S, Lahaye Marc (2004) Physico-chemical characteristics of cell walls from *Arabidopsis thaliana* microcalli showing different adhesion strengths. *J. Exp. Bot.* 55: 2087-2097.
- Logan BE, Wilkinson DB (1991) Fractal dimension and porosities of *Zoogloea ramigera* and *Saccharomyces cerevisiae* aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 389-396.
- Mandelbrot BB (2003) *La Geometría Fractal de la Naturaleza*. Tusquets. Barcelona, España. pp 35-89.
- Milosevic NT, Ristanović D (2009) Cell image area as a tool for neuronal classification. *J. Neurosci. Meth.* 182: 272-278.
- Pépin MF, Smith MAL, Reid JF (1999) Application of imaging tools to plant cell culture relationship between plant cell aggregation and flavonoid production. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 35: 290-295.
- Sánchez CH, Bibriesca CE (2003) Medida de similitud para objetos 2D y 3D a través de una energía de transformación óptima. *Comput. Sist.* 7: 66-75.
- Smith TG, Behar TN (1994) Comparative fractal analysis of cultured glia derived from optic nerve and brain demonstrate different rates of morphological differentiation. *Brain Res.* 634: 181-190.
- SPSS (1999) SigmaScan Pro. User's Guide. SPSS Science Inc. Somers, NY, EEUU.
- Trejo-Tapia G, Jiménez-Aparicio AR, Villareal L, Rodríguez-Monroy M (2001) Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. *Biotechnol. Lett.* 23: 1943-1946.
- Trejo-Tapia G, Hernández-Trujillo R, Trejo-Espino JL, Jiménez-Aparicio A, Rodríguez-Monroy M (2003) Analysis of morphological characteristics of *Solanum chrysotrichum* cell suspension cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 929-932.
- Trejo-Tapia G, Cuevas-Celis J, Salcedo-Morales G, Trejo-Espino JL, Arenas-Ocampo ML, Jiménez-Aparicio A (2007) *Beta vulgaris* L. suspension cultures permeabilized with Triton X-100 retain cell viability and betacyanines production ability: A digital image analysis study. *Biotechnol. Progr.* 23: 259-363.