

# Практическое руководство по оценке морфологии гранул картофельного крахмала методом микроскопирования

В.К. Хлесткин<sup>1, 2</sup>✉, Т.В. Эрст<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Картофельный крахмал – ценное и доступное техническое сырье для целого ряда отраслей промышленности. Для селекции растений, продуцирующих крахмал с оптимальными для переработки свойствами, необходимы эффективные методы оценки физико-химических параметров большого количества образцов крахмала. Соответственно, данные по изменчивости тех или иных фенотипических признаков имеют важное значение как для развития фундаментальных работ по идентификации локусов генома, отвечающих за широкий спектр характеристик крахмала картофеля, так и для прикладных работ по ускоренной селекции новых сортов технического назначения. Оценка размеров крахмальных гранул при помощи микроскопии – один из самых доступных и потому распространенных методов фенотипирования. Нами разработан состоящий из четырех этапов подход к оценке геометрических параметров гранул крахмала: первый этап – выделение крахмала из клубня, второй – получение микрофотографий образцов крахмала, третий – обработка и анализ полученных изображений в свободно распространяемой программе ImageJ, четвертый – построение графиков распределения гранул крахмала по геометрическим параметрам. Показано, что гранулы крахмала различных сортов и гибридов картофеля различаются по морфологии и могут быть дифференцированы методом микроскопии с получением данных о диаметре Фере и округлости частиц. Так, моды диаметра Фере гранул крахмала сортов Алена, Невский и гибрида 785/8-5 составляют 5, 22 и 67 микрон соответственно. В распределении гранул крахмалов этих сортов и гибрида по округлости наблюдаются лишь незначительные отличия. Микрофотографирование гранул крахмала с последующей обработкой изображений представляет собой доступный, экономичный, простой и эффективный подход к фенотипированию сортов и гибридов картофеля *Solanum tuberosum* L. по физико-химическим параметрам крахмала. Этот метод может применяться для ускоренного анализа большого числа образцов на ограниченном количестве природного материала, в том числе в полевых и хозяйственных лабораториях.

Ключевые слова: крахмал; морфология; микроскопирование; диаметр Фере; округлость.

## A practical guide to the starch granules' morphology study by microscopy

V.K. Khlestkin<sup>1, 2</sup>✉, T.V. Erst<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Potato starch is a valuable and affordable technical raw material for a number of industries. For selection of plants producing starch with optimal processing properties effective methods for physicochemical parameters evaluation of a large number of starch samples are needed. Thus, variability of phenotypic traits data are important both for fundamental works on identification of genomic loci responsible for a wide range of potato starch characteristics as well as for applied accelerated selection of new varieties for technical use. Estimating the morphology of starch granules by microscopy is one of the most accessible and therefore widespread methods of phenotyping. We developed a four-step approach to the estimation of the geometric parameters of starch granules. It includes an isolation of starch from the tuber (stage 1), the preparation of micrographs of starch samples (stage 2), processing and analysis of the images obtained in the freely distributed ImageJ program (stage 3), and the construction of distribution curve for starch granules by geometric parameters (stage 4). It was shown that the starch granules of different varieties and hybrids of potato differ in morphology and can be differentiated by microscopy with obtaining data on the Feret's diameter and the circularity of the particles. Thus, typical values of the Feret's diameter of starch granules of "Alena" and "Nevsky" varieties and 785/8-5 hybrid are 5, 22 and 67 microns, respectively. The distributions on circularity of starch granules of these varieties and the hybrid have only minor differences. Light optical microscopy of starch granules followed by digital image analysis is an affordable, economical, simple and effective approach to phenotyping the varieties and hybrids of potato *Solanum tuberosum* L. on the physicochemical parameters of starch. The approach may be applied for accelerated analysis of a large number of samples on a limited amount of natural material in the field and countryside economic laboratories.

Key words: starch; morphology; microscopy; Feret's diameter; circularity.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хлесткин В.К., Эрст Т.В. Практическое руководство по оценке морфологии гранул картофельного крахмала методом микроскопирования. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):728-734. DOI 10.18699/VJ17.290

### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khlestkin V.K., Erst T.V. A practical guide to the starch granules' morphology study by microscopy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):728-734. DOI 10.18699/VJ17.290 (in Russian)

Received 23.07.2017

Accepted for publication 18.09.2017

© AUTHORS, 2017

**К**артофельный крахмал, нативный или переработанный, – ценное и доступное техническое сырье для пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной, химической, строительной и ряда других отраслей промышленности. Для эффективной реализации потенциала картофельного крахмала необходима работа по селекции, инвентаризации и тестированию особых сортов картофеля *Solanum tuberosum* L., способных выступить продуцентами подходящего по физико-химическим свойствам технического крахмала, а также дальнейшей его переработке в продукты с высокой добавленной стоимостью.

На данный момент в мире селекционная и семеноводческая работа переходит на новый технологический уровень. При этом в оценке множества сортов и гибридов картофеля центральную роль играют высокоэффективные поточные методы фенотипирования с низкой себестоимостью, способные дать надежную информацию о полезных признаках растения используя ограниченное количество материала и доступное для удаленных и полевых локаций оборудование. Так, эколого-географические испытания сортов картофеля, проводимые в 2016–2017 гг. в России, подразумевают в том числе и анализ свойств крахмала, полученного из шестидесяти сортов картофеля, выращенных в пяти различных географических локациях.

Несмотря на то что гены, которые кодируют основные ферменты, участвующие в биосинтезе и метаболизме крахмала, в настоящее время выделены и охарактеризованы (Хлесткин и др., 2017), остается неясной роль конкретных структурных генов (а возможно, и участие еще не выявленных регуляторных генов) в формировании тех или иных характеристик крахмала. Поэтому данные по изменчивости фенотипических признаков имеют важное значение как для развития фундаментальных работ по идентификации локусов генома, отвечающих за широкий спектр характеристик крахмала картофеля, так и для прикладных работ по ускоренной селекции новых сортов технического назначения.

### **Оценка морфологии гранул картофельного крахмала**

Гранула картофельного крахмала представляет собой образование размером примерно 5–100 мкм, как правило, овальной формы. Гранула состоит из кристаллических слоев, образованных за счет особой упаковки концевых линейных полисахаридных цепей амилопектина, и из аморфных слоев, образованных амилозой и фрагментами, в которых происходит разветвление цепей амилопектина.

В биосинтезе крахмала в клубнях картофеля принимают участие около двадцати ферментов. Около десяти из них действуют непосредственно внутри или на поверхности крахмальной гранулы, находящейся в пластиде, поэтому морфология крахмальной гранулы связана с активностью некоторых генов биосинтеза крахмала, а также, возможно, с рядом регуляторных участков генома. Таким образом, задача высокопроизводительного фенотипирования сортов и гибридов картофеля по морфологическим признакам крахмальных гранул является актуальной с точки зрения применения современных методов геномной и/или маркер-ориентированной селекции для направленного создания сортов с заданными свойствами крахмала.

Оценка размеров крахмальных гранул при помощи микроскопии – один из самых доступных и потому распространенных методов фенотипирования. Однако в большинстве случаев исследователи ограничиваются качественным описанием формы гранул, иногда проводят наблюдение оптических свойств гранул – окраски после обработки раствором йода либо двулучепреломления в поляризованном свете (Karlsson et al., 2007), без статистического анализа полученных изображений (Blennow et al., 2003). Заметим, что в отличие от более сложных и дорогих подходов (Wilson et al., 2006; Romano et al., 2016), с помощью микроскопии можно провести анализ размеров большой выборки гранул за ограниченное время (Li et al., 2011).

Размер гранул важен для ряда технических и пищевых применений картофельного крахмала: если в пищевой промышленности ценятся сорта с крупными гранулами крахмала, то многие технические решения требуют сортов, содержащих мелкие гранулы (de Vetten, 2004). При этом наряду с диаметром или площадью гранулы необходимо сразу получать информацию, так или иначе характеризующую ее форму. Частицы, имеющие одинаковый наибольший диаметр, могут значительно различаться по форме – от идеально круглых до вытянутых или волокнообразных, поэтому нужны дополнительные данные, дающие представление об их форме.

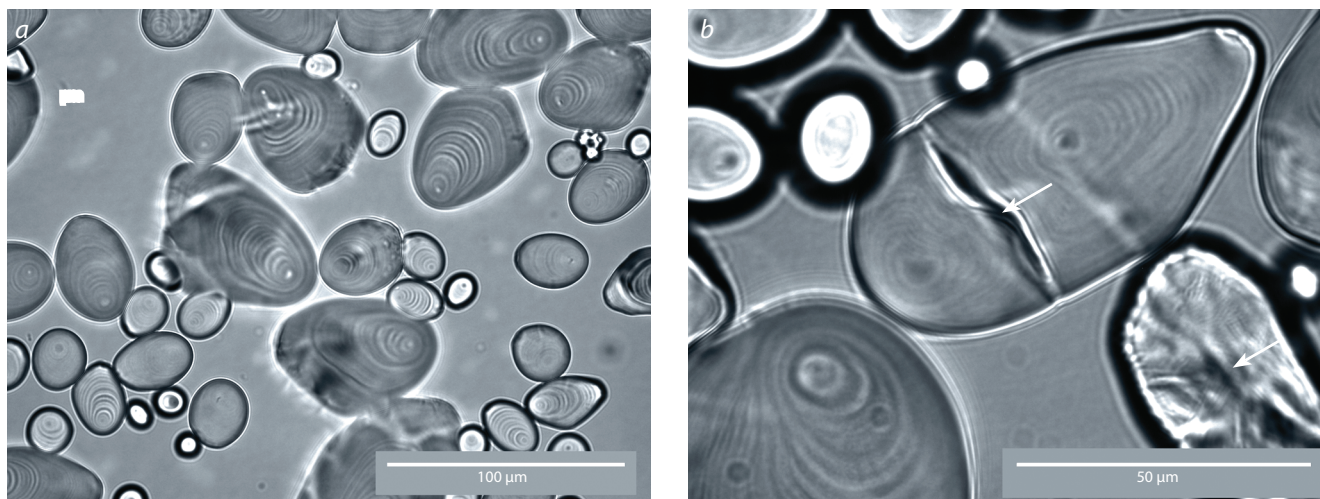
Отметим, что в силу своей доступности, экономичности и объективности в области фенотипирования растений активно развиваются методы, связанные с цифровым анализом изображений (см., например, (Si et al., 2017)). В ходе работы по фенотипированию сортов и гибридов картофеля по физико-химическим признакам крахмала нами разработан подход, позволяющий быстро оценить не только размер гранул, но и их округлость, которая также является важным техническим параметром. В целом для автоматического цифрового анализа микрофотографий доступны более 30 морфологических характеристик. Кроме диаметра и округлости гранул, автоматически может оцениваться площадь изображения гранул, площадь выпуклой оболочки, периметр, отношение площади к периметру, количество включений, координаты центра масс, удлинение, извилистость и другие характеристики.

### **Первый этап. Выделение крахмала из клубней разных сортов и гибридов картофеля**

Картофельный крахмал из клубней сортов и гибридов картофеля из коллекции «ГенАгро» ФИЦ ИЦиГ СО РАН выделяли стандартным методом, основанным на гравитационном осаждении гранул крахмала в воде (см., например, (Chung et al., 2014)).

### **Второй этап. Получение микрофотографий гранул крахмала**

Основные задачи на этом этапе – получить корректное фотографическое изображение гранул крахмала, пригодное для дальнейшей цифровой обработки. Необходимо избегать как скученности гранул крахмала с образованием кластеров, так и излишней разреженности изображений, которая может существенно уменьшить выборку измеря-



**Fig. 1.** Light microscopy image of potato starch granules (Alena cultivar). Magnification: (a)  $\times 252$ , (b)  $\times 630$ . Arrows indicate abnormal granules with corrupted concentric layers.

емых объектов. Желательно обеспечить также хорошую контрастность изображения. Наиболее простой и удобной для оператора формой образца является дисперсия крахмальных гранул в жидкой среде, помещенная между стандартными предметным и покровным стеклами. Хорошая смачиваемость гранул крахмала водой и их относительно невысокая плотность ( $1.54 \text{ г/см}^3$ ) (Isleib, 1958) позволяют использовать воду в качестве среды и отказаться от применения диспергирующих агентов и регуляторов вязкости. Водная суспензия гранул с концентрацией 0.5 % и объемом 20 мкл, нанесенная на предметное стекло, обеспечивает удобную для последующей обработки плотность расположения гранул в освещенном поле: так, чтобы они не перекрывали друг друга.

Для получения репрезентативной выборки проводилось фотографирование не менее четырех различных участков светового поля, чтобы в сумме получить изображение 1500–2500 частиц. При этом неплохие результаты дает съемка в проходящем свете методом светлого поля: все гранулы видны, имеют четкие границы, хорошо выраженную морфологию. При увеличении более чем в 200 раз различается структура гранул с концентрическими чередующимися слоями разной кристалличности вокруг единого центра формирования слоев (рис. 1, а). Можно также увидеть и оценить наличие аномальных гранул, в которых произошло нарушение слоистой структуры в ходе их образования (рис. 1, б).

В случаях, когда микроскопирование гранул крахмала проводится не для изучения деталей их строения, а для оценки их морфологии, рекомендуется получить как можно более контрастное изображение, используя, например, раствор йода (можно взять аптечный раствор йода, разбавленный смесью спирта и воды (1 : 1) в 200 раз). У сортов с обычным содержанием амилозы (~20–30 %) гранулы приобретают темно-синюю окраску, фотографии становятся более контрастными, позволяя достоверно оценить количество, форму и размер гранул. При этом не окрашиваются и не учитываются при подсчете и анализе

органические примеси некрахмальной природы, случайно попавшие в образец при обработке.

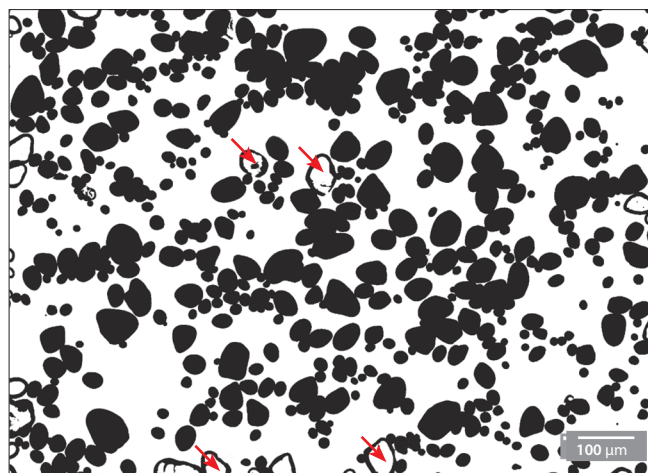
### Третий этап. Обработка микрофотографий гранул крахмала в программе ImageJ

Полученные микрофотографии крахмала удобно обрабатывать в программе ImageJ (ImageJ, 2017). В приложении имеется набор стандартных инструментов, позволяющий изменять контрастность изображений, резкость, сглаживание, обнаруживать границы и выполнять другие повседневные задачи.

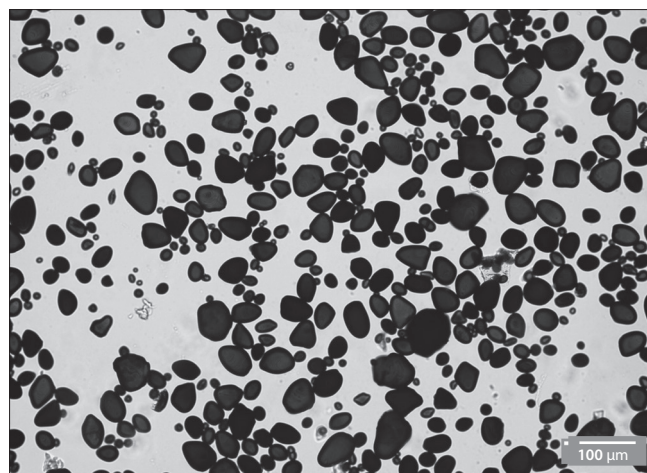
Сначала проводится калибровка программы, например по шкале, сфотографированной в микроскоп через тот же объектив, что и исследуемые образцы (операции «Установить шкалу» (Analyze → Set scale)). Далее можно работать с микрофотографиями гранул крахмала, как с неокрашенными йодом, так и с окрашенными. Для сравнения приведен результат обработки фотографии неокрашенных гранул крахмала в программе ImageJ при помощи последовательности операций «Заполнение областей» (Process → Binary → Fill holes) (рис. 2) и фотография окрашенных гранул крахмала того же сорта без обработки (рис. 3). Видно, что при обработке фотографии неокрашенных гранул некоторые из них не были распознаны как замкнутый объект и, соответственно, будут некорректно учтены программой при подсчете и измерении. Заметим, что большая часть гранул была некорректно распознана из-за того, что они не полностью попали в область фотографирования и находятся у края изображения. При автоматическом распознавании можно не принимать во внимание эти краевые гранулы (в ImageJ предусмотрена такая возможность). Далее мы будем описывать работу только с окрашенными образцами крахмала.

Для проведения подсчета и анализа формы гранул проще работать с 8-битным изображением (Image → Type → 8 bit). Установим пределы распознавания (Image → Adjust → Threshold...) и воспользуемся командой «Применить» (Apply). На полученном изображении видно, какие





**Fig. 2.** Light microscopy image of potato starch granules (Alena cultivar), magnification  $\times 63$ . The image was edited with the ImageJ program, and the Process  $\rightarrow$  Binary  $\rightarrow$  Fill holes option was applied. Arrows point to some incorrectly recognized granules.



**Fig. 3.** Image of iodine-stained potato starch granules (Alena cultivar), magnification  $\times 63$ .

именно частицы будут распознаны для подсчета и анализа. Если границы распознавания выставлены правильно, будут подсчитаны только гранулы крахмала, но не примесные частицы с другими цветовыми характеристиками.

Как видно, две или несколько гранул могут соприкасаться так, что их изображение распознается как единое поле. Для разделения таких полей на отдельные частицы воспользуемся опцией «Водораздел» (Process  $\rightarrow$  Binary  $\rightarrow$  Watershed), которая создает разделительные линии толщиной 1 пиксель между предполагаемыми отдельными частицами.

Теперь зададим параметр для измерения (Analyze  $\rightarrow$  Set measurements...), отметив соответствующие характеристики. В нашем случае были выбраны «Площадь» (Area), «Характеристики формы» (Shape descriptors), «Диаметр Фере» (Feret's diameter).

Запуск процесса измерения осуществляется опцией «Анализировать частицы...» (Analyze  $\rightarrow$  Analyze particles...). В меню надо указать предельные величины площади учитываемых силуэтов на изображении (мы устанавливали величины от 5  $\mu\text{m}^2$  до бесконечности). Для этого поставим «галочку» напротив «Показывать результаты» (Display results), чтобы результаты появились на экране в виде таблицы, и напротив «Исключить краевые» (Exclude on edges), чтобы не учитывать частично видимые гранулы по краям изображения. После этого нажатию кнопки «ОК» получаем таблицу с результатами измерений в окне «Результаты» (Results).

#### Четвертый этап. Минимальная статистическая обработка полученных данных

Программа ImageJ предоставляет некоторые возможности по статистической обработке данных. Так, прямо в окне «Результаты» (Results) в меню «Распределение...» (Results  $\rightarrow$  Distribution...) можно задать требуемые параметры и получить результат в графическом виде.

В нашем случае данные, полученные при анализе нескольких изображений для каждого образца, были ско-

пированы в файл Excel и обработаны с помощью пакета «Анализ данных». Для анализа можно использовать любую предназначенную для этого программу, но поскольку этот протокол рассчитан для работы в любых, в том числе полевых и слабооснащенных лабораториях, имеет смысл пользоваться наиболее распространенным и знакомым программным продуктом, нередко установленным на компьютере «по умолчанию».

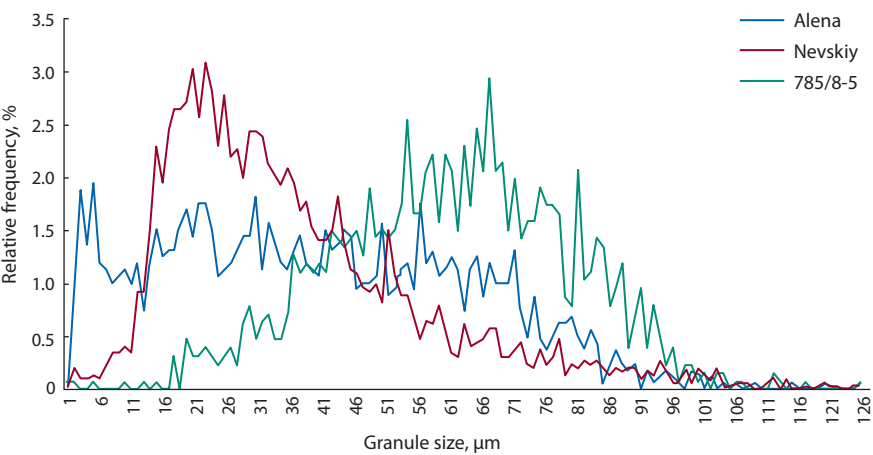
В качестве примера были взяты образцы крахмала сортов Алена, Невский и гибрида 785/8-5. Здесь и далее для каждого образца проанализированы четыре микрофотографии с разных его участков на предметном стекле (250–350 гранул в каждом изображении). Полученные кривые распределения по максимальным диаметрам Фере показаны на рис. 4. Диаметр Фере – это расстояние между касательными к контуру изображения, проведенными параллельно направлению просмотра. В нашем случае для каждой гранулы автоматически выбиралась максимальная величина диаметра Фере и их совокупность представлялась в виде кривой, характерной для рассматриваемого образца крахмала. Видно, что крахмалы сорта Невский и гибрида 785/8-5 имеют преимущественно мономодальное распределение максимальных диаметров Фере с модами 22 и 67  $\mu\text{m}$  соответственно. Гранулы крахмала сорта Алена распределены более равномерно, от 3 до 85  $\mu\text{m}$ , со значительным содержанием мелкой фракции и модой 5  $\mu\text{m}$ . Средние величины максимальных диаметров Фере указаны в таблице.

Округлость гранул оценивалась по формуле

$$\text{Округлость} = 4\pi \times \frac{\text{Площадь изображения гранулы}}{(\text{Периметр изображения гранулы})^2}.$$

Значение округлости, равное 0, формально соответствует бесконечно вытянутому многоугольнику, значение, равное 1, соответствует идеальному кругу.

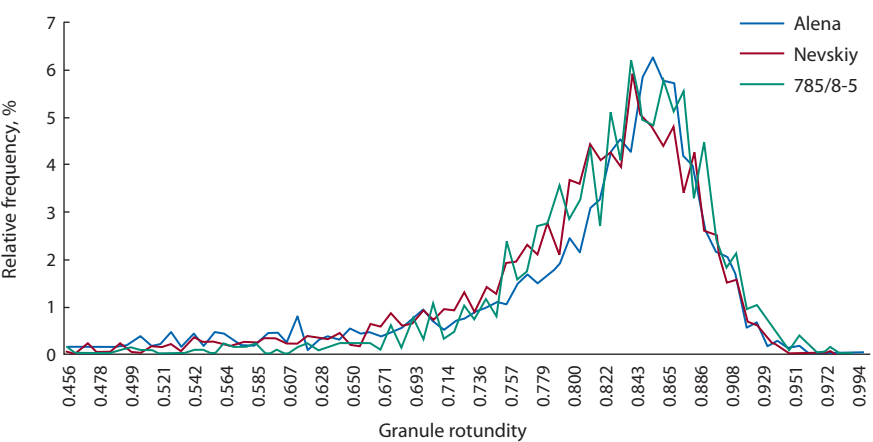
По графику округлости гранул (рис. 5) можно отметить, что крахмал сорта Алена имеет немногим более высокую моду округлости и более узкое распределение. Гранулы



**Fig. 4.** Distribution of starch granules from Alena and Nevskiy cvs. and from hybrid 785/8-5 by maximum Feret diameters.

Mean values of maximum Feret diameters and rotundity and their standard deviations

Variety, hybrid	Mean values, M ± SEM	
	maximum Feret diameter, μm	rotundity
Alena	37.58 ± 20.09	0.78 ± 0.15
Nevskiy	25.64 ± 21.69	0.85 ± 0.08
785/8-5	52.21 ± 14.68	0.85 ± 0.04



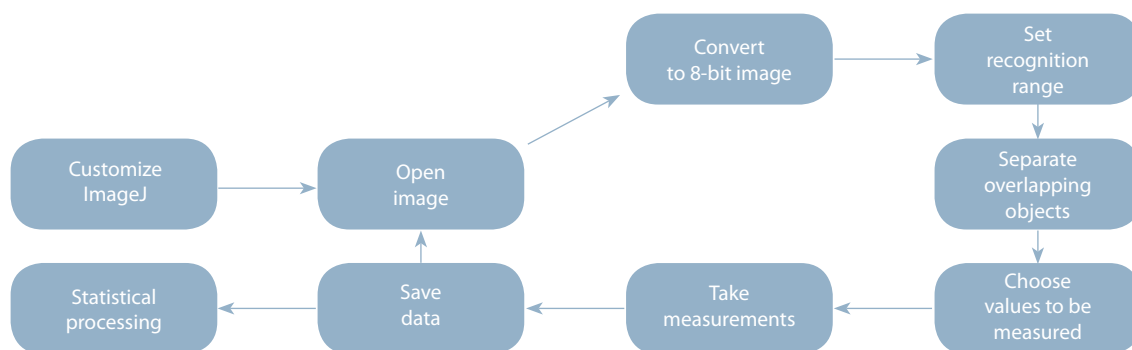
**Fig. 5.** Distribution of starch granules from Alena and Nevskiy cvs. and from hybrid 785/8-5 by rotundity.

крахмала сорта Невский и гибрида 785/8-5 менее округлые и отличаются несколько большим содержанием фракций 0.75–0.82. Средние величины округлости гранул крахмала приведены в таблице.

Описанный метод фенотипирования сортов и гибридов картофеля по микрофотографическим изображениям крахмала в сочетании со статистической обработкой будет в числе других использован при исследовании коллекции картофеля «ГенАгро» ФИЦ ИЦиГ СО РАН для выявления контрастных форм и связи с соответствующими генными сетями биосинтеза крахмала для дальнейшего применения в маркер-ориентированной селекции картофеля на полезные технологические признаки.

**Протокол выделения крахмала из клубней картофеля**

1. Отобрать два-три характерных для данного сорта или гибрида клубня картофеля без повреждений (средний вес одного клубня составляет примерно 90 г).
2. Клубни отмыть от земли, высушить после мытья, взвесить.
3. Измельчить на механической терке или соковыжималке, дважды пропустив биомассу клубня через устройство.
4. Отфильтровать полученную массу через тканевый фильтр (диаметр отверстий не менее 250 мкм), отжать.
5. Отфильтрованную массу, оставшуюся на ткани, перенести в мерный стакан с дистиллированной водой. Соотношение массы к объему воды примерно 1 : 2.
6. Взболтать несколько раз в течение 15 мин, отфильтровать полученную взвесь через тканевый фильтр (диаметр отверстий не менее 250 мкм), отжать.
7. Отфильтрованную массу, оставшуюся на ткани, опять поместить в мерный стакан с таким же количеством воды.
8. Взболтать несколько раз в течение 15 мин, отфильтровать полученную взвесь через тканевый фильтр (диаметр отверстий не менее 250 мкм), отжать.
9. Оставшуюся на фильтре мезгу высушить при комнатной температуре, взвесить.
10. Фильтрат оставить в покое при комнатной температуре на 90 мин, при этом происходит осаждение крахмала.
11. Декантировать жидкость, оставляя крахмал на дне.
12. Добавить к крахмалу ~300 мл воды, взболтать, оставить на 90 мин.
13. Декантировать жидкость, оставляя крахмал на дне.
14. Добавить к крахмалу 200 мл воды, взболтать, оставить на 90 мин.
15. Декантировать жидкость.
16. Влажный крахмал перенести на чашку Петри, высушить при комнатной температуре, периодически перемешивая.
17. Взвесить высушенный крахмал, определить препаративный выход (типичный выход – 10–20 % от массы исходного картофеля).



**Fig. 6.** Flow chart of image processing according to the protocol for microscopic assessment of potato starch granule morphology, steps 6–14.

### Протокол оценки морфологии гранул картофельного крахмала методом микрофотоирования (рис. 6)

1. Шпателем измельчить 5 мг крахмала, поместить в пробирку и добавить 1 мл дистиллированной воды.
2. К полученной смеси добавить 50 мкл раствора йода в водно-спиртовой смеси (можно использовать разбавленный в 200 раз смесью воды и спирта (1:1) аптечный раствор йода). Встряхнуть на шейкере.
3. Пипетированием взболтать содержимое пробирки до состояния суспензии и отсутствия осадка окрашенного крахмала на дне, нанести 20 мкл суспензии на предметное стекло и накрыть.
4. Получить не менее четырех микрофотографий с разных участков образца крахмала (250–350 гранул в каждом изображении).
5. Откалибровать ImageJ для работы с изображениями в микрометрах.
6. Открыть изображение гранул крахмала.
7. Выполнить преобразование в 8-битный рисунок (Image → Type → 8 bit).
8. Установить «Пределы распознавания...» (Image → Adjust → Threshold...), нажать «Применить» (Apply).
9. Разделить соприкасающиеся частицы «Водораздел» (Process → Binary → Watershed).
10. Выбрать измеряемые параметры (Analyze → Set measurements...).
11. Провести измерение (Analyze → Analyze particles...).
12. Скопировать или сохранить результаты измерений из получившейся таблицы в формате, читаемом программой для последующей обработки, например Excel.
13. Повторить шаги 6–12 для остальных изображений этого же образца.
14. При необходимости организовать данные в графическом виде.

### Необходимые материалы и оборудование

1. Вода дистиллированная и набор лабораторной посуды для выделения крахмала.
2. Микроскоп с возможностью получения фотографических изображений гранул крахмала. В данной работе проводилась съемка в проходящем свете методом светлого поля. Использовался прямой исследовательский микроскоп Axio Scope A1 (Carl ZEISS), объектив –

A-Plan 10x/0.25, CCD камера – AxioCam ICc 3, Адаптор – TV 2/3" C 0.63x, программное обеспечение ZEN, общее увеличение 10 (объектив) × 10 (окуляр) × 0.63 (адаптор).

3. Программа ImageJ для подсчета и измерения гранул крахмала.

### Заключение

Гранулы картофельного крахмала различных сортов и гибридов различаются по морфологии и могут быть исследованы методом микроскопии. Так, типичные величины диаметра Фере гранул крахмала сортов Алена, Невский и гибрида 785/8-5 составляют 5, 22 и 67 мкм соответственно. Микрофотографирование гранул крахмала с последующей обработкой микрофотографий представляет собой доступный, экономичный, простой и эффективный подход к фенотипированию сортов и гибридов картофеля *Solanum tuberosum* L. по физико-химическим параметрам крахмала, который может применяться для ускоренного анализа большого числа образцов на ограниченном количестве природного материала, в том числе в полевых и хозяйственных лабораториях.

### Acknowledgments

The development of the protocol for assessment of the morphology of starch granules was supported by State Budgeted Project 0324-2017-0001, additional subproject on bioresource collections. Microimaging, computerized processing, and analysis of starch samples were supported by the Russian Foundation for Basic Research, project RFFI-NSO 17-44-540510. Potato samples were received from the collection of Shared Access Center Agro, ICG, Novosibirsk. The authors are grateful to the staff of the Shared Access Center for Microscopic Analysis of Biological Objects, Siberian Branch of the RAS, and, personally, to Dr. T.E. Aleshina for assistance in the photography of starch samples.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Blennow A., Hansen M., Schulz A., Jurgensen K., Donald A.M., Sanderson J. The molecular deposition of transgenically modified starch in the starch granule as imaged by functional microscopy. *J. Struct. Biology.* 2003;143:229-241. DOI 10.1016/j.jsb.2003.08.009.

- Chung H.-J., Li X.-Q., Kalinga D., Lim S.-T., Yada R., Liu Q. Physico-chemical properties of dry matter and isolated starch from potatoes grown in different locations in Canada. *Food Res. Int.* 2014;57:89-94. DOI 10.1016/j.foodres.2014.01.034.
- ImageJ. An open platform for scientific image analysis. Available at: <http://imagej.net/Welcome>. (Accessed 24.07.2017)
- Isleib D.R. Density of potato starch. *Am. Potato J.* 1958;35(3):428-429. DOI 10.1007/BF02851300.
- Karlsson M.E., Leeman A.M., Björck I.M.E., Eliasson A.-C. Some physical and nutritional characteristics of genetically modified potatoes varying in amylose/amylopectin ratios. *Food Chem.* 2007;100: 136-146. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.09.032.
- Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Target genes for development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars with desired starch properties. *Selskokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology.* 2017;52(1):25-36. (in Russian)
- Li X.-Q., Zhang J., Luo S., Liu G., Murphy A., Leclerc Y., Xing T. Effects of sampling methods on starch granule size measurement of potato tubers under a light microscope. *Int. J. Plant Biol.* 2011;2(e5): 14-18. DOI 10.4081/pb.2011.e5.
- Romano A., Mackie A., Farina F., Aponte M., Sarghini F., Masi P. Characterization, in vitro digestibility and expected glycemic index of commercial starches as uncooked ingredients. *J. Food Sci. Technol.* 2016;53(12):4126-4134. DOI 10.1007/s13197-016-2375-9.
- Si Y., Sankaran S., Knowles R., Pavek M.J. Potato tuber length-width ratio assessment using image analysis. *Am. J. Potato Res.* 2017; 94(1):88-93. DOI 10.1007/s12230-016-9545-1.
- de Vetten N.C.M.H. Method for modifying the size and/or morphology of starch granules. Pat. EP1473307A1, 2004.
- Wilson J.D., Bechtel D.B., Todd T.C., Seib P.A. Measurement of wheat starch granule size distribution using image analysis and laser diffraction technology. *Cereal Chemistry.* 2006;83(3):259-268. DOI 10.1094/CC-83-0259.