

Die anatomie en histochemie van *Grewia lasiocarpa* E. Mey. ex Harv. (Malvaceae)

Outeurs:

Nneka A Akwu
Yougaspheer Naidoo
Moganavelli Singh

Affiliaties:

Universiteit van KwaZulu-
Natal, Durban, Suid-Afrika

Korresponderende outeur:

Nneka A Akwu
E-pos: akwu.nk@gmail.com

Datums:

Ontvang: 13/05/20
Aanvaar: 16/09/20
Gepubliseer: 24/11/20

Hoe om hierdie artikel aan te haal:

Akwu Nneka A, Naidoo
Yougaspheer, Singh
Moganavelli, Die anatomie
en histochemie van
Grewia lasiocarpa E. Mey.
ex Harv. (Malvaceae),
*Suid-Afrikaanse Tydskrif
vir Natuurwetenskap en
Tegnologie* 39(1) (2020).
[https://doi.org/10.36303/
SATNT.2020.39.1.793](https://doi.org/10.36303/SATNT.2020.39.1.793)

An English copy of this
paper is available online at
[http://www.satnt.ac.za/
index.php/satnt/article/
view/793](http://www.satnt.ac.za/index.php/satnt/article/view/793)

Kopiereg:

© 2020. Authors.
Licensee: *Die Suid-
Afrikaanse Akademie vir
Wetenskap en Kuns*.
Hierdie werk is onder
die Creative Commons
Attribution License
gelisensieer.

Grewia lasiocarpa E. Mey. ex Harv. staan in die algemeen bekend as bosrosyntjie vanweë sy eetbare, rooi-bruin, 4-lobbige vrugte, wat swart word soos hulle verouder. Die genus *Grewia* word maklik herken aan hul uitsonderlike morfologie (eetbare vrugte, kristalle, trigome) en oorvloedige medisinale kenmerke (antimikrobies, anti-inflammatories, anti-oksident). Om hierdie spesie van die ander *Grewia*-spesies te onderskei, is met die studie beoog om die morfologie, ultrastruktuur van die blare, stingelbas en sekresie-strukture van *G. lasiocarpa* te beskryf aan die hand van mikroskopiese tegnieke en histochemiese toetse. Die morfologiese en anatomiese studies het die teenwoordigheid van klieragtige trigome getoon. Een tipe skildvormig, drie tipes knobbelvormig en nie-klieragtige (enkelvoudig, stervormig en veelkantig-stervormig) trigome kom op die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* voor. Die histochemiese ondersoek het getoon sekere primêre en sekondêre metaboliete soos stysel, proteïene, slym, lignien (polifenole) en alkaloiëde kom in die blare, stingelbas en haarkleed voor. Hierdie is die eerste verslag oor die studie van die morfologie, ultrastruktuur en histochemie van die blare en stingelbas van *Grewia lasiocarpa*. Die kenmerke van die blare en stingelbas sal geskik wees om hierdie spesie van die ander in hierdie genus te onderskei, sy outentisiteit te bevestig en by te dra tot die farmakognosiese gebruike en algemene kennis.

Sleutelwoorde: *Grewia lasiocarpa*; knobbelvormige trigome; skildvormige trigome; slymerige idioblaste; histochemie.

The anatomy and histochemistry of *Grewia lasiocarpa* E. Mey. ex Harv. (Malvaceae): *Grewia lasiocarpa* E. Mey. ex Harv is commonly known as the forest raisin(s) due to its edible red-brown 4-lobed fruit(s), which turn black as they age. The genus is easily recognised by its distinctive morphology (edible fruits, crystals, trichomes) and abundant medicinal properties (antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant). In order to distinguish this species from other *Grewia* species, this study aimed to describe the morphology, ultrastructure of the leaves, stem bark and secretory structures of *G. lasiocarpa* using microscopic techniques and histochemical tests. The morphological and anatomical studies revealed the presence of glandular trichomes. One type of peltate, three types of capitate and non-glandular (simple, stellate, multangulate-stellate) trichomes were found on the leaves and stem bark of *G. lasiocarpa*. The histochemical investigation revealed that certain primary and secondary metabolites such as starch, protein, mucilage, lignin (polyphenols) and alkaloids are present in the leaves, stem bark and indumentum. This is the first report on the morphological, ultrastructure and histochemical studies of leaves and stem bark of *Grewia lasiocarpa*. This structural characterisation of the leaves and stem bark would help to distinguish this species from others in this genus, its ascertain authenticity, contribute to the pharmacognostic usage and general knowledge.

Keywords: *Grewia lasiocarpa*; capitate trichome; peltate trichome; mucilaginous idioblasts; histochemistry

Inleiding

Die familie Malvaceae staan algemeen bekend as malvas ** [voorheen ook Sparrmanniaceae of Tiliaceae] (Johnson 1990; Baser 1995; Ibrahim *et al.* 2018). Hulle kom voor in tropiese en gematigde streke, en sluit 3 020 spesies in en 192 genera met veertien subtribusse (Morton 1987; Nep *et al.* 2013). 'n Vroeëre klassifikasie het *Grewia* as die enigste genus beskryf wat eetbare vrugte produseer (Morton 1987), maar daar is tans verskeie genera in die familie Malvaceae bekend wat eetbare vrugte produseer bv. *Abelmoschus*, *Azanza*, *Corchorus* en *Dombeya*.

Die genus *Grewia*, wat na Nehemiah Grew (1641–1712) vernoem is, kom oorwegend in Suid-Afrika, Arabië, Madagaskar, die Himalaya-streke, Indië, Pakistan, China, Myanmar, die Pasifiese eilande (Tonga en Samoa), Maleisië, Thailand, noordelike Australië en Bangladesh voor met 690 gepubliseerde spesies (binome) (Bayer & Kubitzki 2003; Wahlert *et al.* 2015). In Suid-Afrika kom 27 inheemse spesies voor soos *G. occidentalis*, *G. flavescens* en *G. bicolor* (Boon & Pooley 2010).

Grewia lasiocarpa kom meesal voor op klipperige dagsome al met die kus langs vanaf die misgordelwoude van die Oos-Kaap tot KwaZulu-Natal, asook in tropiese woude en op hul rande (Boon & Pooley 2010).

Die mikroskopiese ondersoek van plante gedurende hulle groei en ontwikkeling, hul genetiese manipulerings en kweking, is belangrik want die waarnemings wat van hierdie ondersoek bekome word, is merkwaardig (Payne 1978; Svoboda *et al.* 2000). Van die belangrike kenmerke is trigome wat klieragtig of nieklieragtig kan wees (Naidoo *et al.* 2011; Raghu *et al.* 2019; Bantho *et al.* 2020). Die belangrikheid van 'n omvattende morfologiese ondersoek van plante kan nie onderskat word nie omdat dit baie geskik is vir die bevestiging van die egtheid, die vasstelling van die ekonomiese belangrikheid, die bepaling van die beste metodes vir verwerking en die opspoor van vreemde strukture (Svoboda *et al.* 2000; Ibrahim *et al.* 2018). Geografiese lokaliteit beïnvloed die fitokomponente wat in plante voorkom as gevolg van abiotiese faktore soos variërende klimaat, temperatuur, reënval, hoogte bo see-spieël, daglengte en UV-bestraling. Hierdie faktore het 'n direkte invloed op die biosintese van sekondêre metaboliete (Khalid *et al.* 2012).

Oor die algemeen kan plante nie sonder primêre metaboliete oorleef nie, terwyl die afwesigheid van sekere sekondêre metaboliete nie tot onmiddellike dood sal lei nie, maar tot langtermyn skade aan die fisiologiese prosesse (Agostini *et al.* 2012). Die aanwesigheid van primêre metaboliete in die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* is reeds gerapporteer (Akwu *et al.* 2019; Akwu *et al.* 2019). Slegs enkele verslae is bekend oor die morfologie en

ultrastruktuur van die blare, blomme en stingelbas van *Grewia* spp. bv. *G. laevigata* Vahl (Sankhyan *et al.* 2008), *G. multiflora*, *G. huluperakensis*, *G. polygama* en *G. laevigata* (Chung 2005). Hierdie spesies vertoon morfologiese en anatomiese variasies en is daarom wetenskaplik verskillend.

Die hoofdoel en doelwit van hierdie studie is om die morfologie, ultrastruktuur en histochemie van die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* te bestudeer deur konvensionele saamgestelde lig, stereomikroskopie, fluoressensie- en elektronmikroskopie (skandeer-elektronmikroskopie [SEM] en deurstraal-elektronmikroskopie [TEM]), en om verkreeë resultate met ander gerapporteerde *Grewia*-spesies te vergelyk.

Materiaal en metodes

Materiaal gebruik

Gesonde plantorgane (blare en stingelbas) van *Grewia lasiocarpa* is van plante versamel in die Umdoni Trust Park-area, suidelike KwaZulu-Natal, Suid-Afrika. Die materiaal is dadelik in lugdigte sakkies op ys geberg. Die taksonomiese identifisering van die materiaal is deur dr. Syd Ramdhani, kurator van die Skool vir Lewenswetenskappe, Universiteit van KwaZulu-Natal gedoen, en kontrole-eksemplare word by die Ward Herbarium, Skool vir Lewenswetenskappe, Westville Kampus geberg, onder die herbariumnommer *Nneka 002*.

Stereomikroskopie

Die morfologie en digtheid van die verskillende soorte trigome op die adaksiale en abaksiale vlakke van ewekansig gekose vars blare van onderskeidelik ontluikende (< 1 cm), jong (< 1-5 cm) en volwasse blare (5-10 cm), sowel as ewekansig gekose jong, fotosintetiserende/groen, kruidagtige stukkie stingel is ondersoek. Foto's is van al die relevante strukture geneem met behulp van 'n Nikon AZ100-stereomikroskoop wat met 'n AZ-LED-ring, 'n Nikon Vesel-beligter en NIS-D Elements-sagteware toegerus is.

Monstervoorbereiding: elektron- en ligmikroskopie

Skandeerelektronmikroskopie (SEM)

'n Skandeerelektronmikroskoop is gebruik om die morfologie en verspreiding van die trigome op die blaarvlakke (adaksiaal en abaksiaal) te bepaal. Die blare is ewekansig gekies t.o.v. hul relatiewe groottes soos vir *Grewia lasiocarpa*.

Die vars blare afkomstig van die drie ontwikkelingstadiums en stukkie stingelbas is in klein stukkie verdeel, ongeveer 2-3 X 4.0 mm², en gebruik vir 'n soortgelyke S.E.M.-tegniek soos deur Naidoo *et al.* (2013) beskryf is, met 'n klein wysiging in die gebruik van 2.5% glutaraldehyd en 0.5% osmiumtetroksied vir respektiewelik die primêre en sekondêre fikserings.

** Hierdie naam moet nie verwar word met *Pelargonium*-soorte wat in die Afrikaanse volksmond as "malvas" bekend staan nie.

Vriesdroging

Addisionele stukkie vars materiaal van die drie ontwikkelingsstadiums van *G. lasiocarpa* se blare en stingelbas is in vloeibare stikstof (-196°C) geplaas, waarna die sneë verder in 'n Edwards Modulyo-vriesdroër gevries is (Edwards High Vacuum International Ltd, UK), by -40°C tot -60°C en onder 'n vakuum van 10⁻¹ Torr vir 72 uur. Die stukkie materiaal is op geelkoperskyfies met koolstofgeleiband geplak, twee maal met goudspatsels bedek in 'n Polaron SC500 Sputter Coater (afkomstig van Quorum Technologies Ltd, UK) onder 'n vakuum van 0.1 Torr. Die blaar- en stingelstukkie is met behulp van 'n Zeiss Ultra-Plus FEG-Skanderelektronmikroskoop by 20 kV bestudeer.

Trigoom- en stoma-indeks (kwantitatiewe mikroskopie)

Die mikrograwe van die SEM-analise van volwasse blare, is gebruik om die trigoom- (Stace 1965) en stoma-indeks (Salisbury 1928) te bepaal aan die hand van die volgende vergelykings:

(1) *Stomata indeks (SI)*

$$= \frac{\text{Stomatadigtheid (SD)}}{\text{Stomatadigtheid (SD)} + \text{Epidermale seldigtheid (ECD)}} * 100$$

Waar SD = Getal stomata per mm²; ECD = Getal epidermisselle binne die mm² eenheidarea

(2) *Trigoomindeks (TI)*

$$= \frac{\text{Trigoomindeks (TD)}}{\text{Trigoomdigtheid (TD)} + \text{Epidermale seldigtheid (ECD)}} * 100$$

Waar TD = Getal trigome per mm²; ECD = Getal epidermisselle binne die mm² eenheidarea

Waar 'n halwe deel van óf 'n epidermissel, stoma (stoma-opening omgrens deur twee sluitselle), óf 'n trigoom binne die eenheidarea val, is die selle bygetel. Die opname is vir vyf replikas gedoen en die gemiddeld aangeteken.

Transmissie-elektronmikroskopie (TEM)

Vars blare van *G. lasiocarpa*, by verskillende ontwikkelingsstadiums (ontluikend, jonk en volwasse), word in klein stukkie opgesny van ongeveer 2–3 x 5 mm². 'n Gewysigde metode, van die tegniek soos deur Naidoo *et al.* (2011) beskryf, is toegepas. Die wysiging is slegs in die gebruik van 2.5% glutaraldehyd en 0.5% osmiumtetroksied (OsO₄) vir respektiewelik die primêre en sekondêre fikserings.

Ligmikroskopie

Ewekansig gekose stukkie blare en stingelbas, afkomstig van die materiaal wat vir die T.E.M.-ondersoek ingebed is, is met 0.05% toluidienblou gekleur. Die materiaal is mikroskopies ondersoek en gefotografeer met behulp van 'n Nikon Eclipse 80i saamgestelde ligmikroskoop en 'n Nikon DS-Fil-kamera met NIS-Elements-beeldverwerkingsagteware.

Histochemie

Vryhandsneë van vars blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* is aan verskillende histochemiese toetse onderwerp om die aanwesigheid en lokaliteite van sekere fito-metaboliete te toon, soos tanniene, lipiede en alkalioiede. Die volgende toetse is uitgevoer:

Wagner en Dittmar se reagens vir alkalioiede (Johansen 1940; Furr & Mahlberg 1981); rutheniumrooi vir suuragtige polisakkariiede bv. nieveresterde pektiene en vir slym (Johansen 1940; Jensen 1962; Bornman *et al.* 1969); NADI-reagens vir terpenoiede van essensiële olies (David & Carde 1964); yster-trichloried vir fenoliese samestellings (Johansen 1940; Gabe 1968); toluïdienblou vir gekarboksileerde polisakkariiede en polifenole; broomfenolblou vir totale proteïene; floroglucinol vir lignienaldehyd; III en IV (Sudan-rooi) vir lipiede (Lison 1960), Nylblou vir lipiede (Cain 1947; Ascensão & Pais 1987); fluoressensie-analise met akridienoranje vir deoksiribonukleïensuur (DNS) (Martin & Ortiz 1967) en calcofluorwit vir sellulose (Mitra & Loqué 2014). Die ongekleurde sneë is as kontrole gebruik (resultate nie getoon). Die sneë is met 'n Nikon Eclipse 80i saamgestelde ligmikroskoop (Nikon, Japan) ondersoek en gefotografeer.

Statistiese data-analise

Die kwantitatiewe data (gemiddeld en standaardafwyking) is met behulp van Microsoft Excel se spreistaatfunksies en die *Statistical Package for the Social Science (SPSS)* 25 rekenaar-programme ontleed.

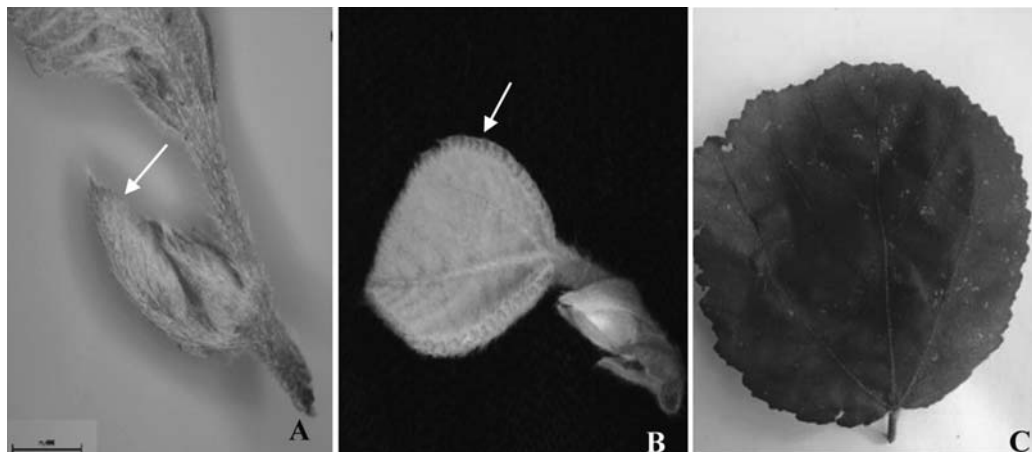
Resultate

Waarnemings van die blare met behulp van 'n stereomikroskoop en die SEM toon dat die ontluikende en jong blare baie digter behaar is as die volwasse blare (fig. 1A–C). Abaksiaal op die blare is vyf opvallende syare met groepe trigome op hulle (fig. 1D). Die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* sekreter gom (fig. 2A & B). Nieklieragtige trigome (aangedui met pyltjies) (fig. 3A) en klieragtige trigome (bruin kolle) (fig. 3A) kom op die blare voor. Nieklieragtige trigome (fig. 3B) is opvallend op die stingelbas. Soortgelyk aan die abaksiale blaaroppervlak (fig. 1D), kom groepe nieklieragtige trigome al met die hoofaar op die adaksiale vlak voor (fig. 3A).

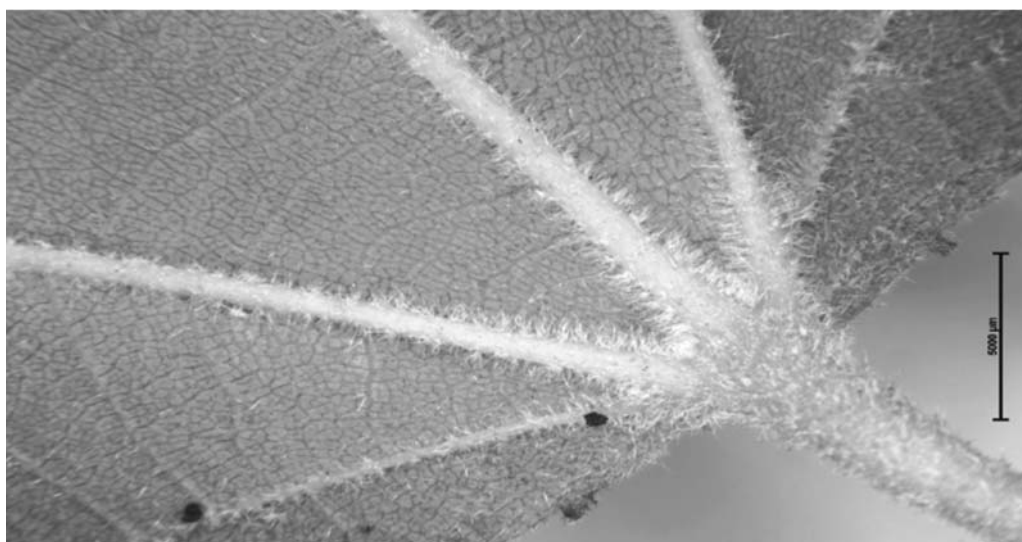
Die S.E.M.-mikrograwe het ook aangetoon dat die adaksiale en abaksiale vlakke van die drie ontwikkelingsstadiums van die blare wat bestudeer is, variërende grade trigoomgroepe bevat in die orde van ontluikend > jong > volwasse (fig. 4A–C). Die nieklieragtige trigome kom ook langs die hoof- en syare van die blare voor (fig. 4A–C) asook op die stingelbas (fig. 4D). Verskillende tipes strukturele trigome kom op die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* voor, naamlik enkelvoudige trigome wat lank en spitslopend is (fig. 5Ai), vertakte groepe trigome met verskillende subtipes (fig. 5Aii & iii – 6Bi & ii), stervormige trigome sonder 'n sentrale kussing (fig. 5Ci–Fi) en stervormige trigome met 'n sentrale kussing (fig. 5Gi–Ii) en subtipes. Veel gevarieerde ster-

vormige trigome met talryke arms (fig. 5Ji) en veelhoekige trigome (fig. 5Ki). Twee tipes klieragtige trigome kom op die blaarlamina en stingelbas voor, naamlik knobbelvormige en skildvormige klieragtige trigome (fig. 6A & B). Drie

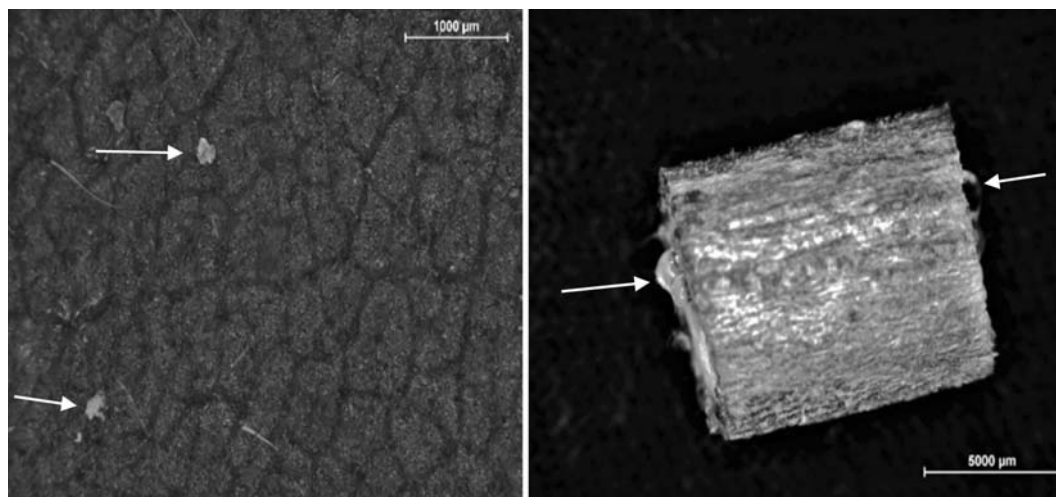
tipes knobbelvormige trigome is op die blare van *G. lasiocarpa* waargeneem, naamlik tipe met 'n kort eensellige steel en 'n meersellige, geronde klierkop (fig. 6Ai), tipe met kort, eensellige steel en 'n meersellige, elliptiese klierkop



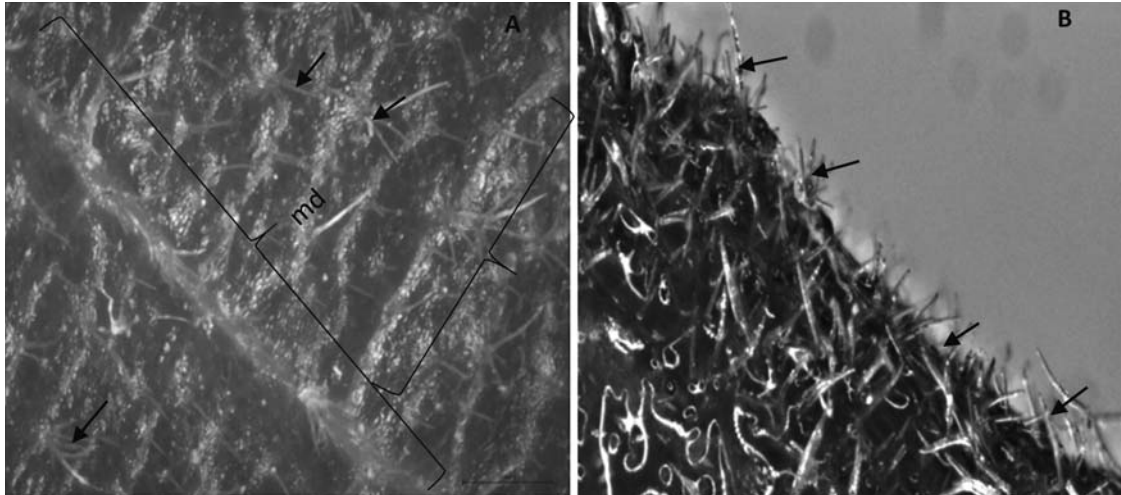
FIGUUR 1 (A-C): Blare van *Grewia lasiocarpa*: (A) ontluikend, (B) jong, (C) volwasse. Ontluikende en jong blare dig behaar (trigome), volwasse blare yl behaar (trigome).



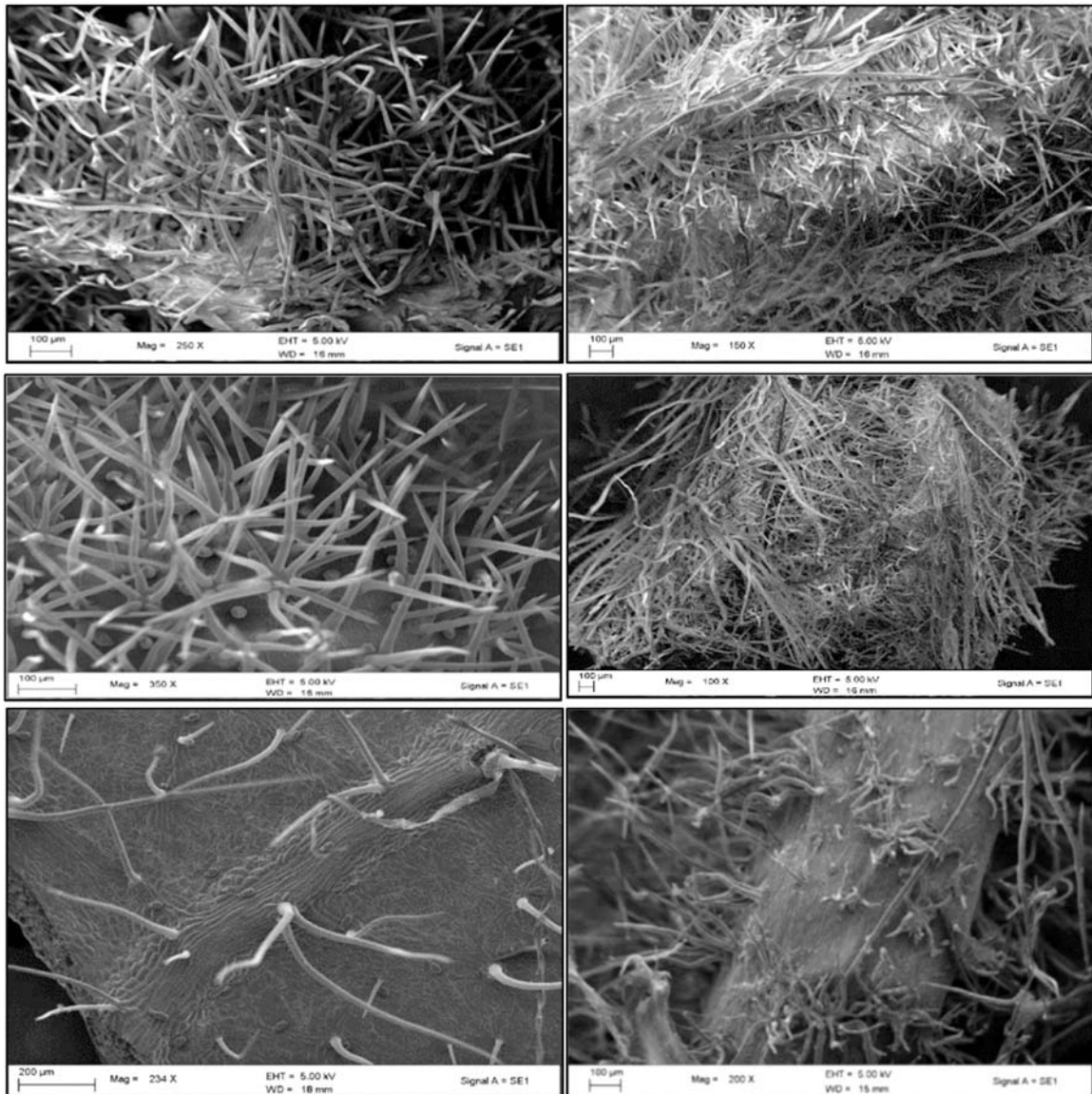
FIGUUR 1D: Abaksiale oppervlak van *Grewia lasiocarpa*-blaarbasis wat die hoofaar en digte groepe trigome al met die are langs toon.



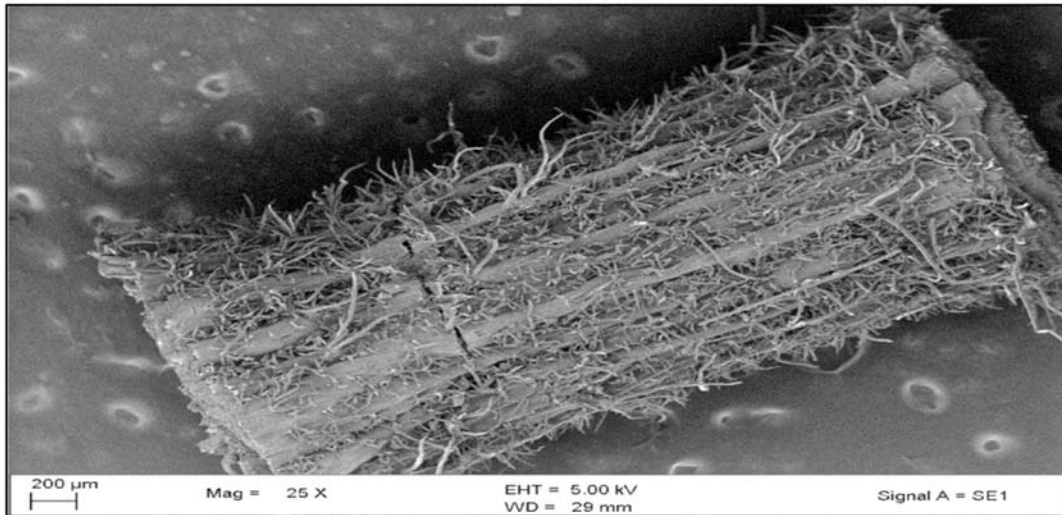
FIGUUR 2 (A & B): (A) Die adaksiale vlak van 'n volwasse blaar met epidermale selle – die pyltjies wys na die gom en (B) 'n stukkie van die stingelbas van *Grewia lasiocarpa* (pyltjies dui die gom aan).



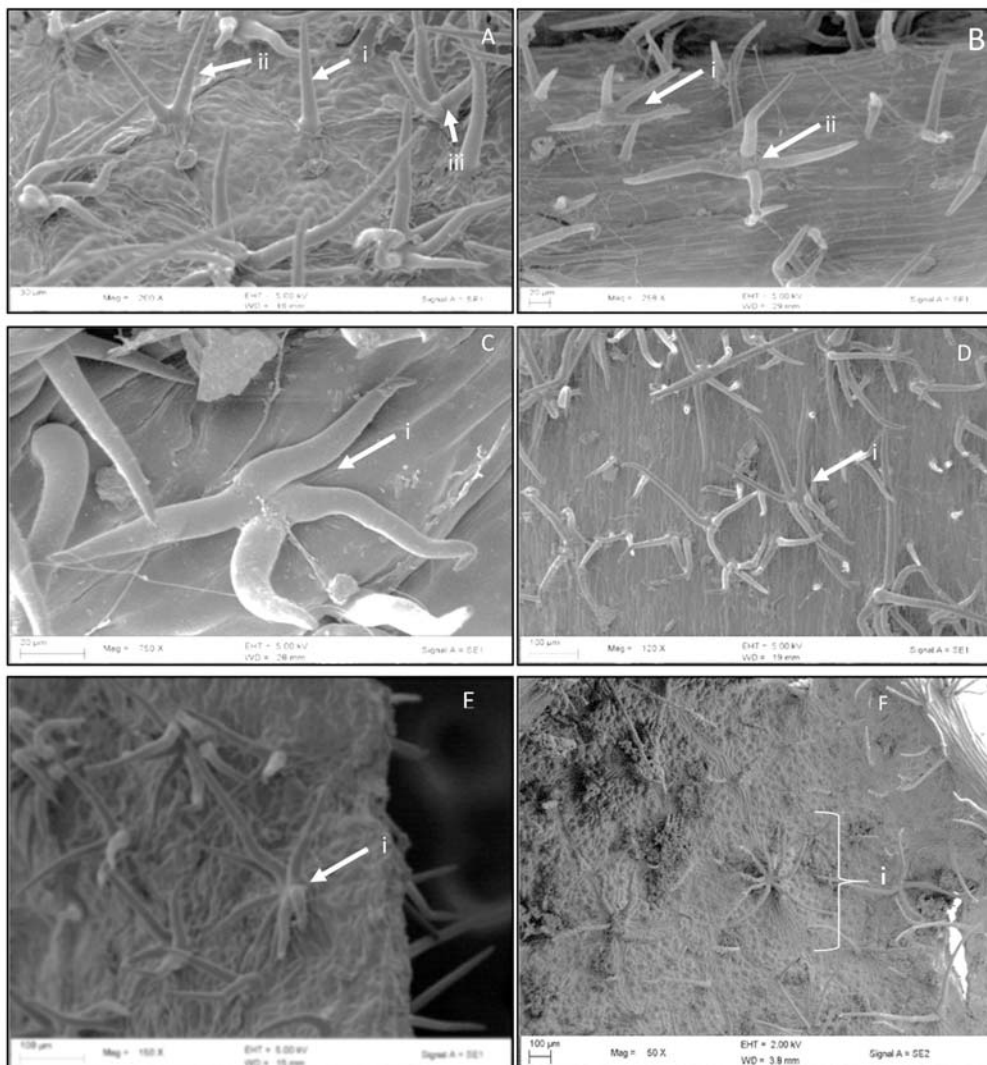
FIGUUR 3 (A & B): (A) Adaksiale vlak van 'n volwasse blaar, en (B) fotosintetiese/groen deel van 'n stingel van *Grewia lasiocarpa*. (md) hoofaar, (v) syaar.



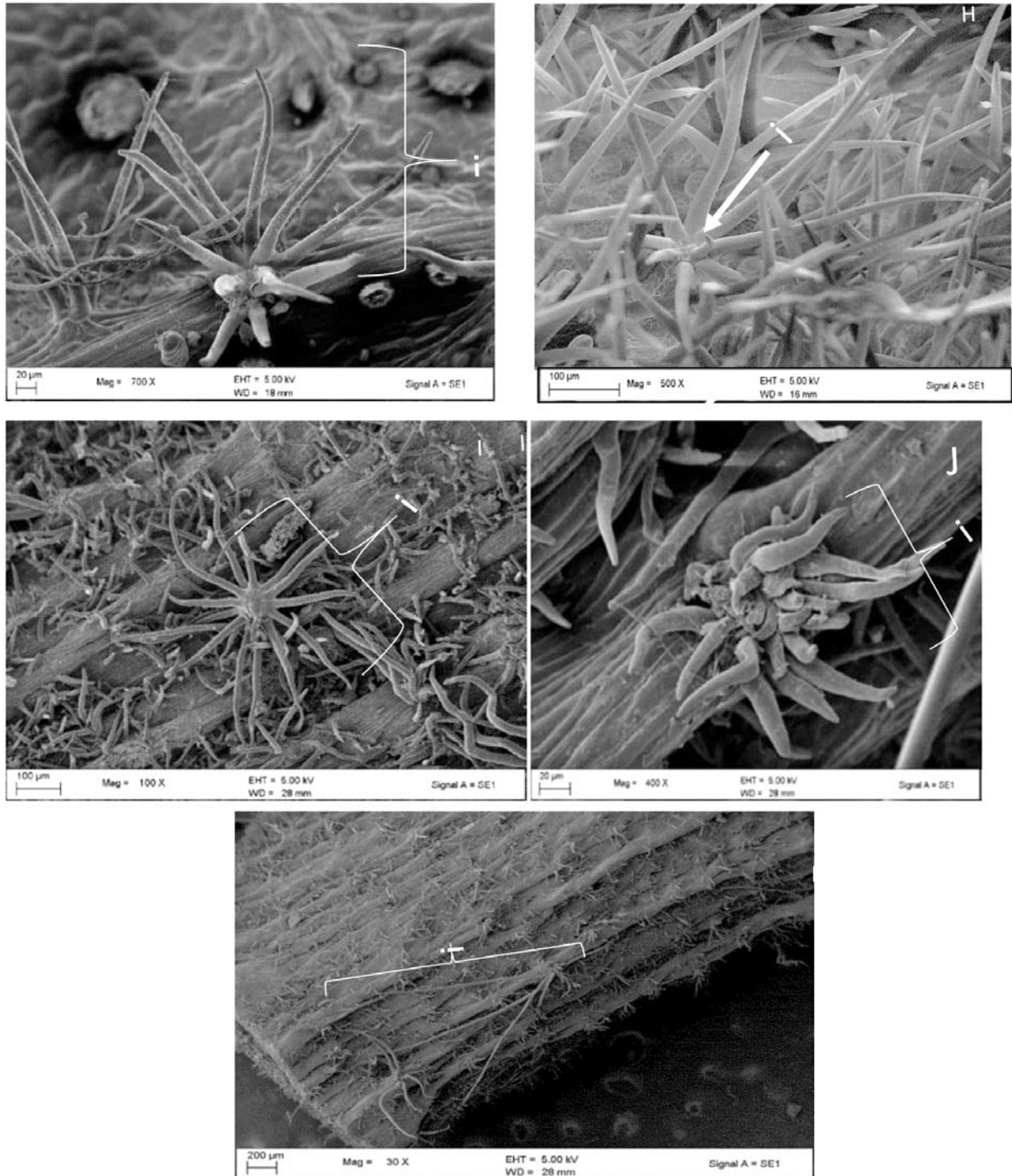
FIGUUR 4 (A–C): Adaksiale (i) en abaksiale vlakke van (A) ontluikende; (B) jong; en (C) volwasse blare van *Grewia lasiocarpa*.



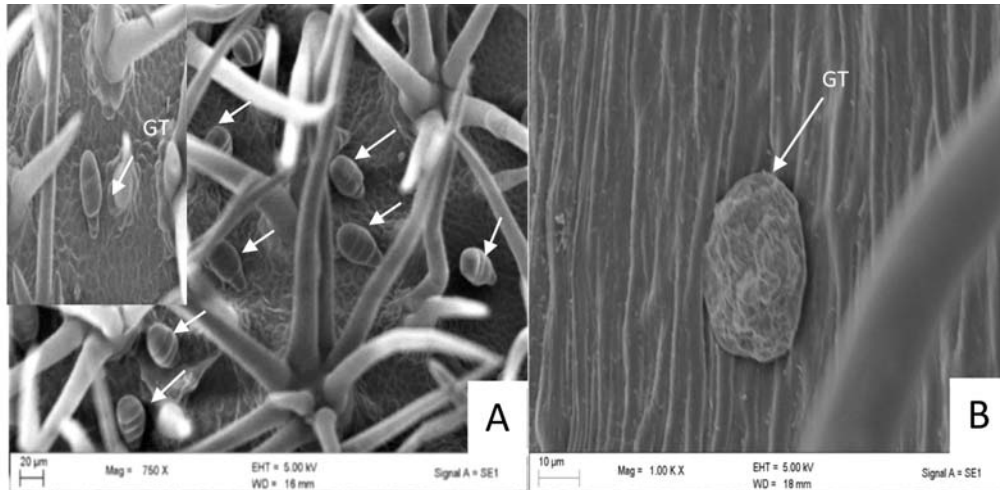
FIGUUR 4D: SEM-mikrograaf van stingelbas van *Grewia lasiocarpa*.



FIGUUR 5 (A-K): Verskillende tipes strukturele (nieklieragtige) trigome op die blare en stingelbas van *Grewia lasiocarpa*. Enkelvoudige (6Ai); 2-armig (6Aii), 3-armig (6Aiii), 4-armig (6Bi en ii) klossievormig; 4-armig (6Ci), 6-armig (6Di), 7-armig (6Ei), 8-armig (6Fi), 11-armig (6Gi) stervormig sonder 'n sentrale kussing; 8-armig (6Hi), 13-armig (6Ii) en stervormig met 'n sentrale kussing; multi-uitstralende (6Ji) en veelhoekige trigome (6K).

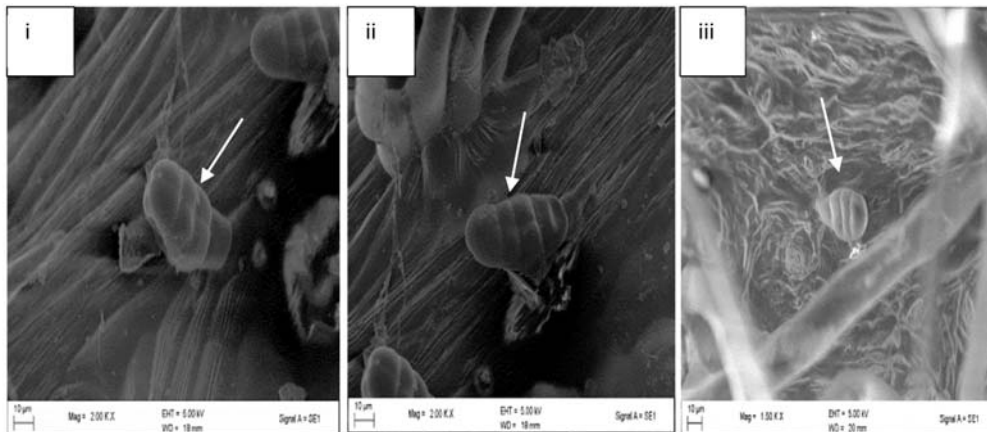


FIGUUR 5 (A-K): Verskillende tipes strukturele (nieklieragtige) trigome op die blare en stingelbas van *Grewia lasiocarpa*. Enkelvoudige (6Ai); 2-armig (6Aii), 3-armig (6Aiii), 4-armig (6Bi en ii) klossievormig; 4-armig (6Ci), 6-armig (6Di), 7-armig (6Ei), 8-armig (6Fi), 11-armig (6Gi) stervormig sonder 'n sentrale kussing; 8-armig (6Hi), 13-armig (6Ii) en stervormig met 'n sentrale kussing; multi-uitstralende (6Ji) en veelhoekige trigome (6K).

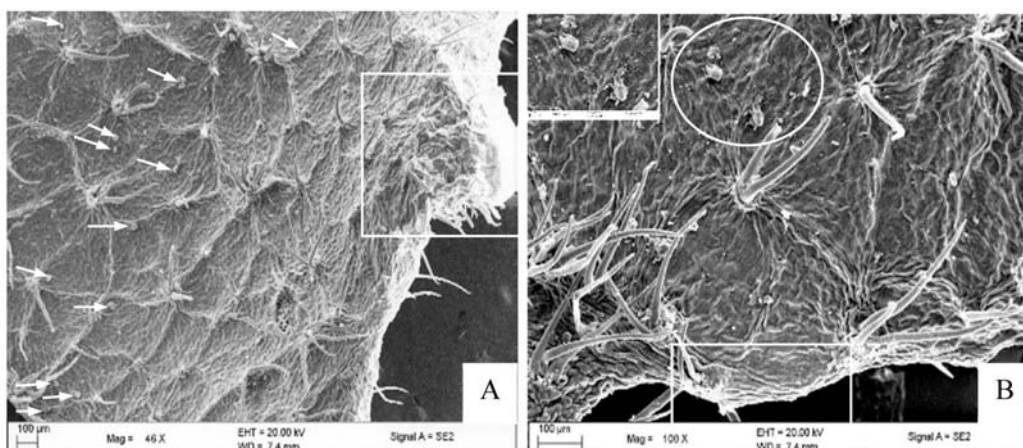


FIGUUR 6 (A & B): Klieragtige trigome van *Grewia lasiocarpa*.

(A) Adaksiale vlak met klem op die knobbelvormige trigome (pyltjie) van die blaarlamina wat ingebed is, te midde van nieklieragtige trigome; (B) skildvormige trigome op die stingelbas (gevriesdroog). (GT) Klieragtige trigome.

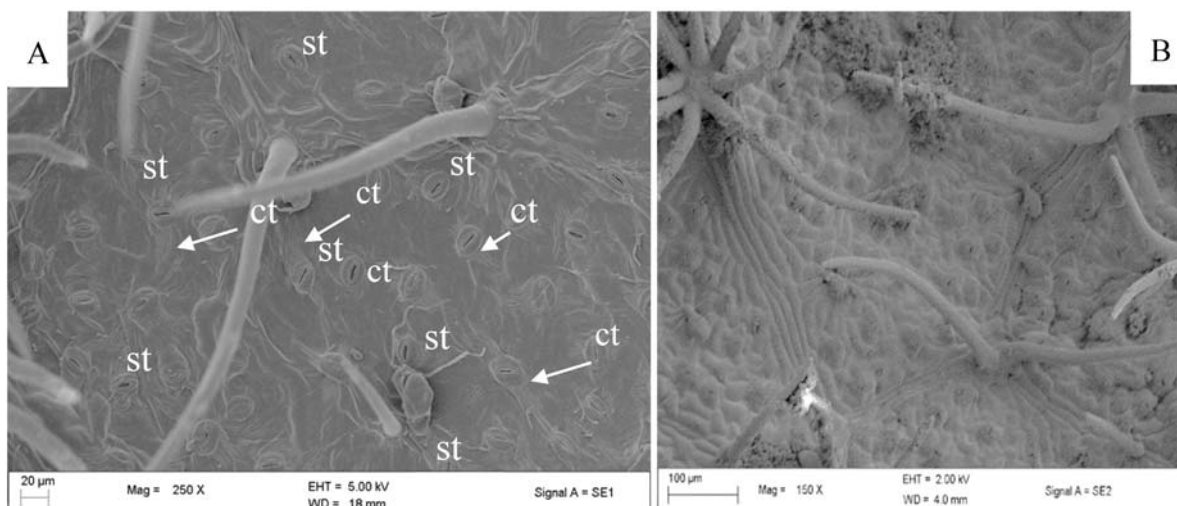


FIGUUR 6A (i-iii): Verskillende soorte knobbelvormige, klieragtige trigome wat op die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* voorkom – pyltjies dui die klieragtige trigome aan.

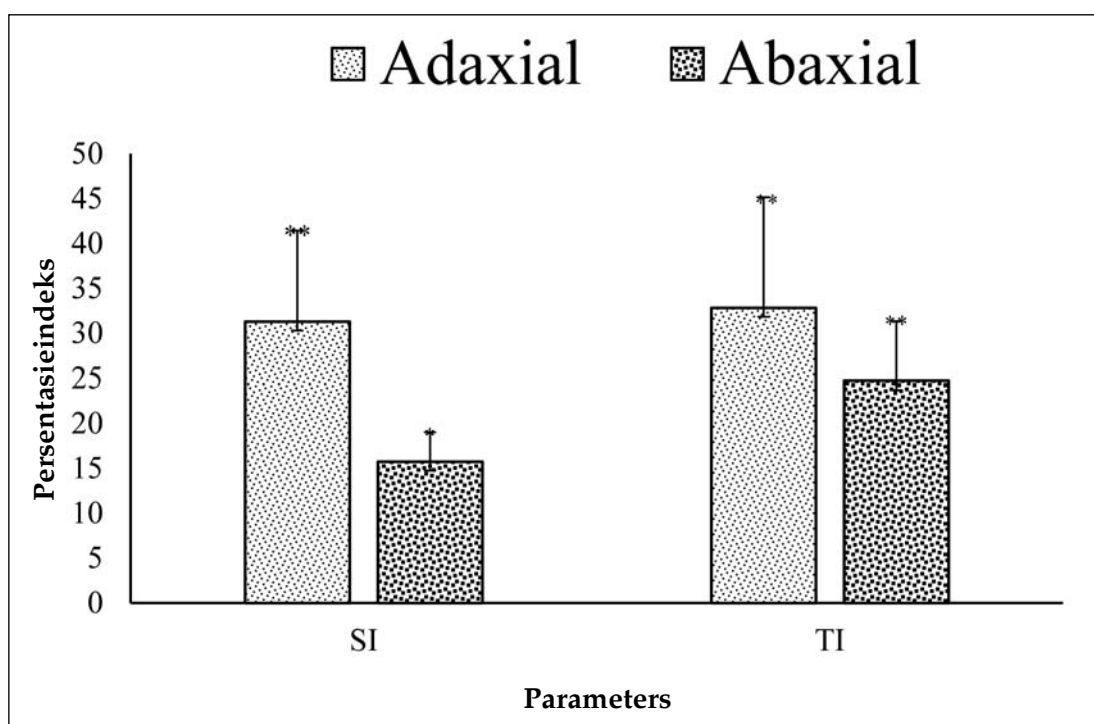


FIGUUR 7 (A & B): Rigting van klieragtige trigome op die adaksiale vlak van *Grewia lasiocarpa*-blare.

Reghoek: apikale punt van blaar; vierkant en sirkel: klieragtige trigome, pyltjie dui rigting van klieragtige trigome.



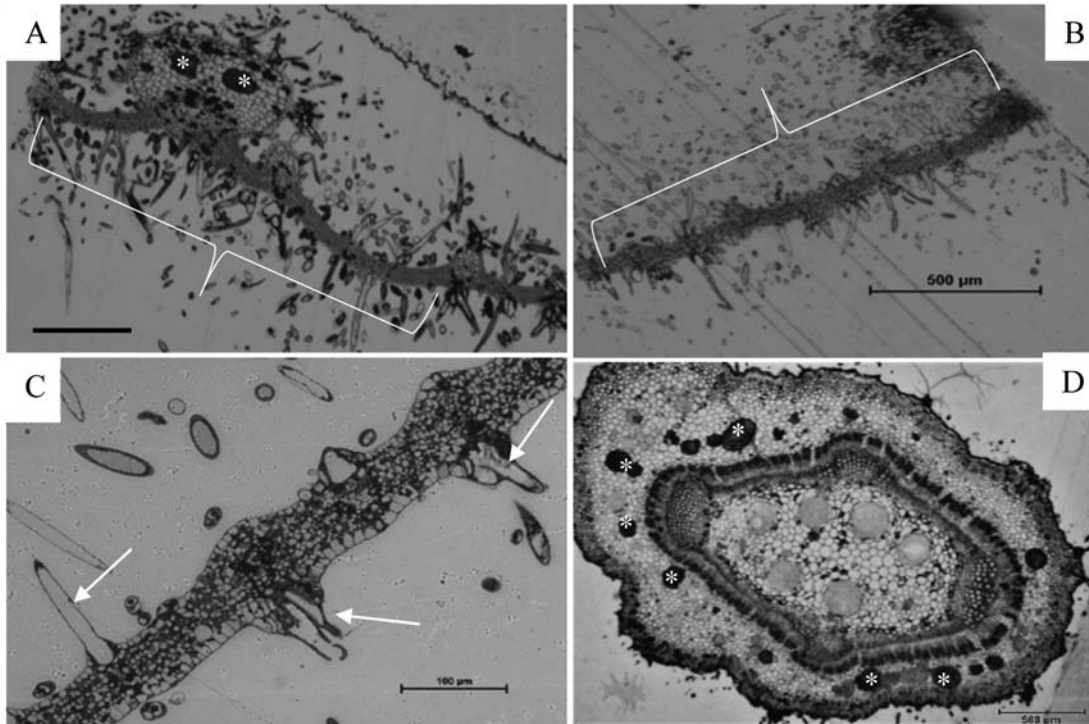
FIGUUR 8 (A & B): Volwasse blare van *Grewia lasiocarpa* wat parasitiese stomata op die abaksiale vlak van die blaarlamina toon. (A) Chemiesgefikseerde blaar wat oop en geslote stomata toon; (B) vriesgedroogde blaar wat epidermisselle op die blaarlamina toon. (st) stomata, (ct) gestreepte kutikula.



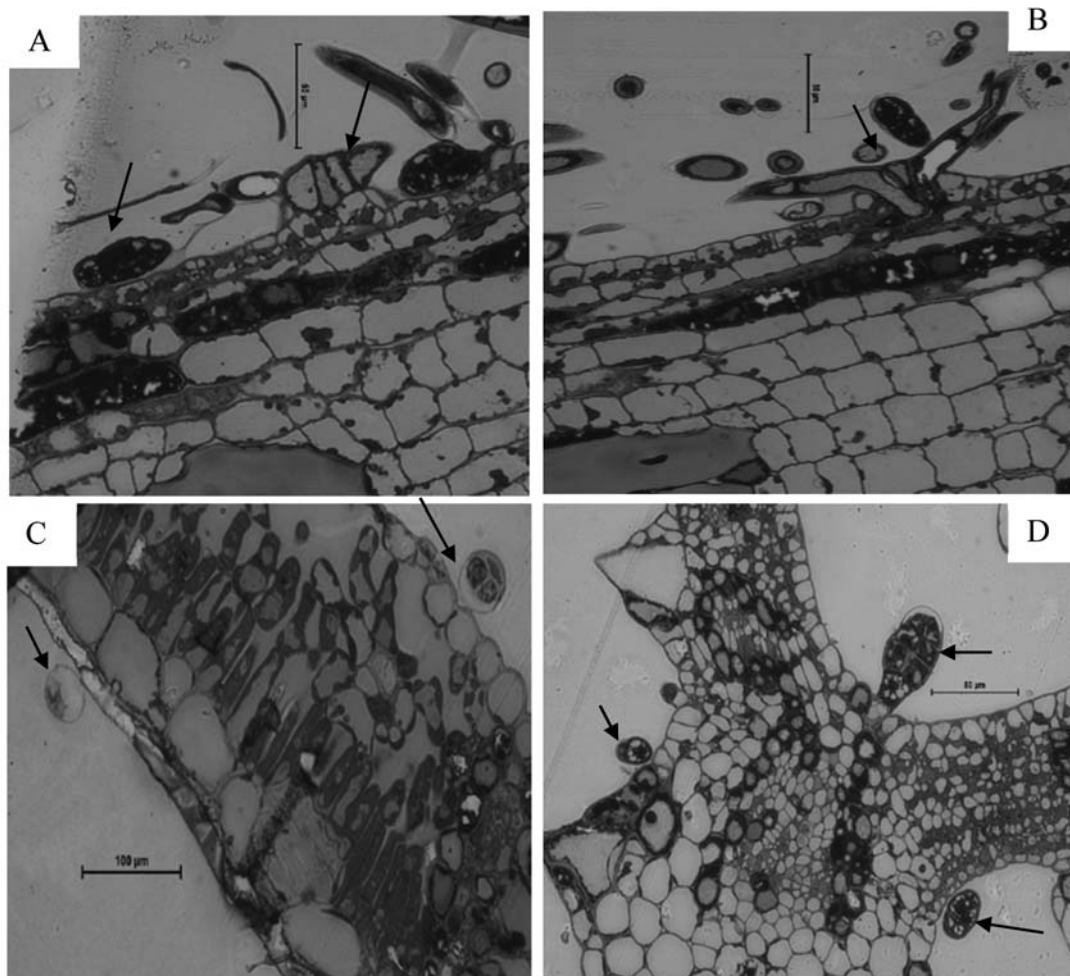
FIGUUR 9: Gemiddelde stomatale en trigoomindekse van die adaksiale en abaksiale oppervlakte van volwasse blare van *Grewia lasiocarpa*. (SI = stomatale indeks, TI = trigoomindeks)

(fig. 6Aii), en tipe met kort eensellige steel met 'n meersellige langwerpige klierkop (kyk pyltjie) (fig. 6Aiii). Die koppe van die knobbelvormige, klieragtige trigome op die adaksiale blaaroppervlak is almal na die blaarpunt gerig (fig. 7A & B). Twee epidermisselle is waargeneem wat parallel aan die langas van stomas se sluitselle voorkom (fig. 8A & B). Die stomata- en trigoomgetalle op die adaksiale en abaksiale vlakke van volwasse blare is bepaal aan die hand van die formules vir stomadigheid (SI) en trigoomdigtheid (TI) en 'n variasie in die digthede tussen die twee vlakke is waargeneem. 'n Hoër persentasie van beide SI en TI is vir die adaksiale vlakke waargeneem (fig. 9).

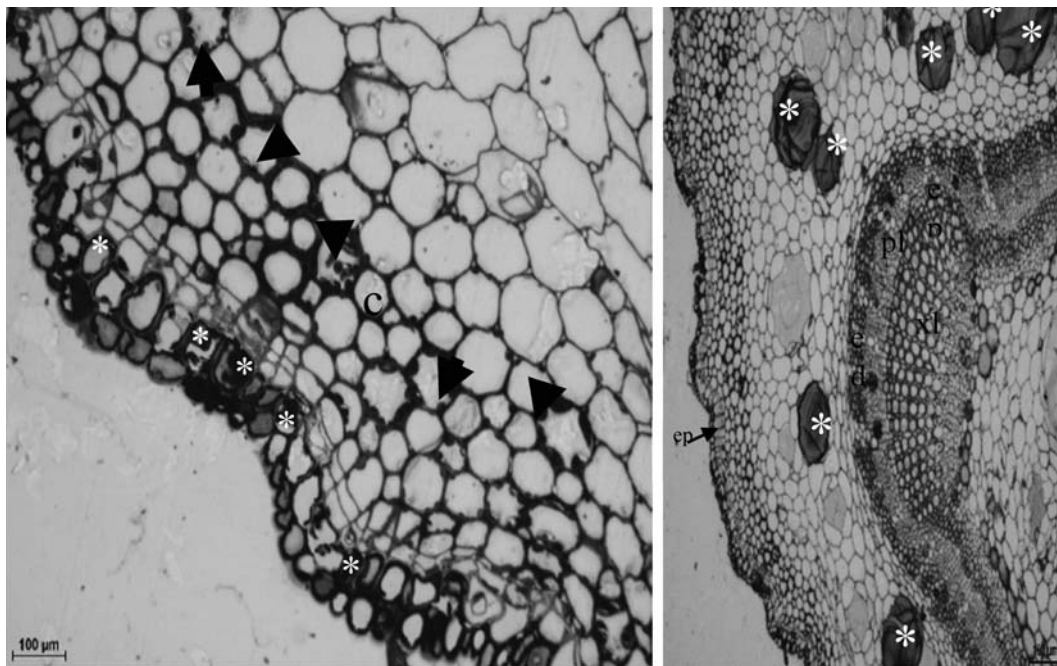
Blaarsneë wat met 0.05% toluidienblou gekleur en met 'n ligmikroskoop bestudeer is, toon dat die getal trigome afneem in die orde van ontloukend > jong > volwasse blare (fig. 10A–C). Hierdie waargeneemde ontwikkeling word met verbreding van die blaar geassosieer. Die slymagtige selle is opvallend op die blaar se hoofaar en stingel van *G. lasiocarpa* (fig. 10A & D), weens die geharde natuur van die stingelbas en jong fotosintetiese/groen kruidagtige deel van die stingel wat ondersoek is. Die aanwesigheid van struktuur en klieragtige trigome (knobbelvormig en skildvormig), word deur die ligmikroskopiese ondersoek bevestig (fig. 11A–D). Ligmikroskopie het ook die teenwoordigheid van tanniene bevestig, wat groen onder die ligmikroskoop



FIGUUR 10 (A–D): Dwarssneë van *Grewia lasiocarpa*-blare en stingelbas. (A) ontluikend; (B) jong; (C) volwasse blare; (D) stingelbas, pyltjie dui die nieklieragtige trigome aan. *klieragtige selle



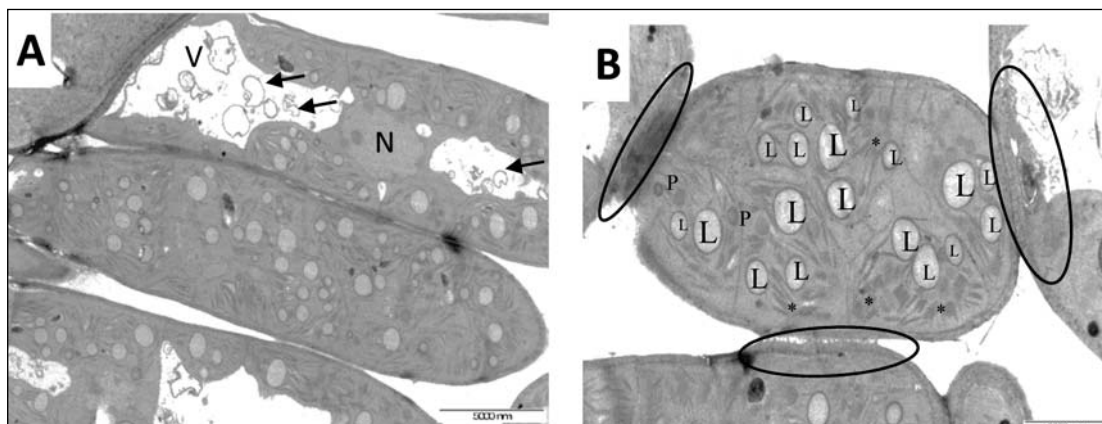
FIGUUR 11 (A–D): Ligmikroskopiese sneë van blare van *Grewia lasiocarpa*, (A) vroeë ontwikkelingstadium van 'n enkelvoudige trigoom; (B) ten volle ontwikkelde struktuur-trigoom; (C) skildvormige trigome; (D) knobbelvormige en skildvormige trigome met pyltjies aangedui.



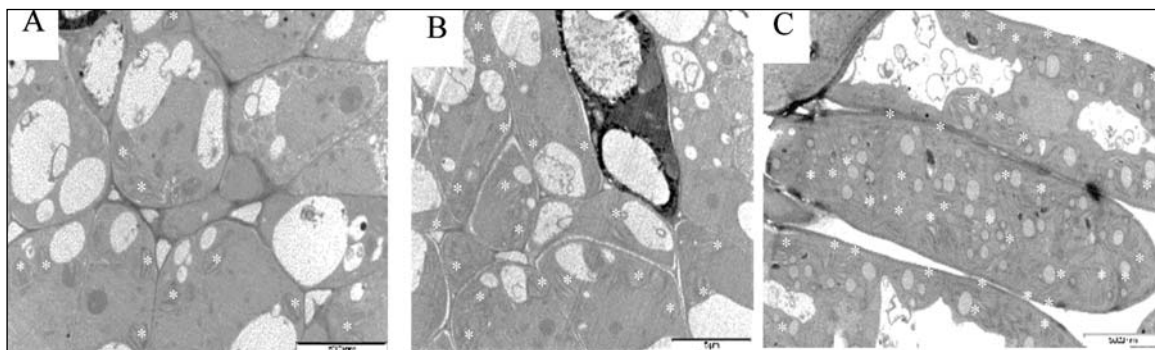
Figuur 12 (A & B): (A) Dwarssnee van die stingelbas van *Grewia lasiocarpa* toon groenblou verkleuring van die tanniene op die felleemagtige laag (asterisks) en deposito's van tanniene (pyltjies) rondom die korteks (ct); (B) slymagtige idioblaste (*) met toluidienblou gekleur; (ep) epidermis met kutikula; (ct) korteks; (ed) endodermis; (pl) floëem; (xl) xileem.

vertoon, asook slymagtige selle in die stingelbas van *G. lasiocarpa* (fig. 12A & B). Die blare van *G. lasiocarpa* is ryk aan lipiede (fig. 13A & B). Meer plastiede was teenwoordig in die dwarsnee van die volwasse blare as by die jong blare en nog minder by die ontluikende blare (fig. 14A–C).

Die blare van *G. lasiocarpa* is ryk aan lipiede (fig. 13A & B). Meer plastiede is waargeneem in die dwarsnee van volwasse blare as in die jong blare en verder nog minder in die ontluikende blare (fig. 14A–C).



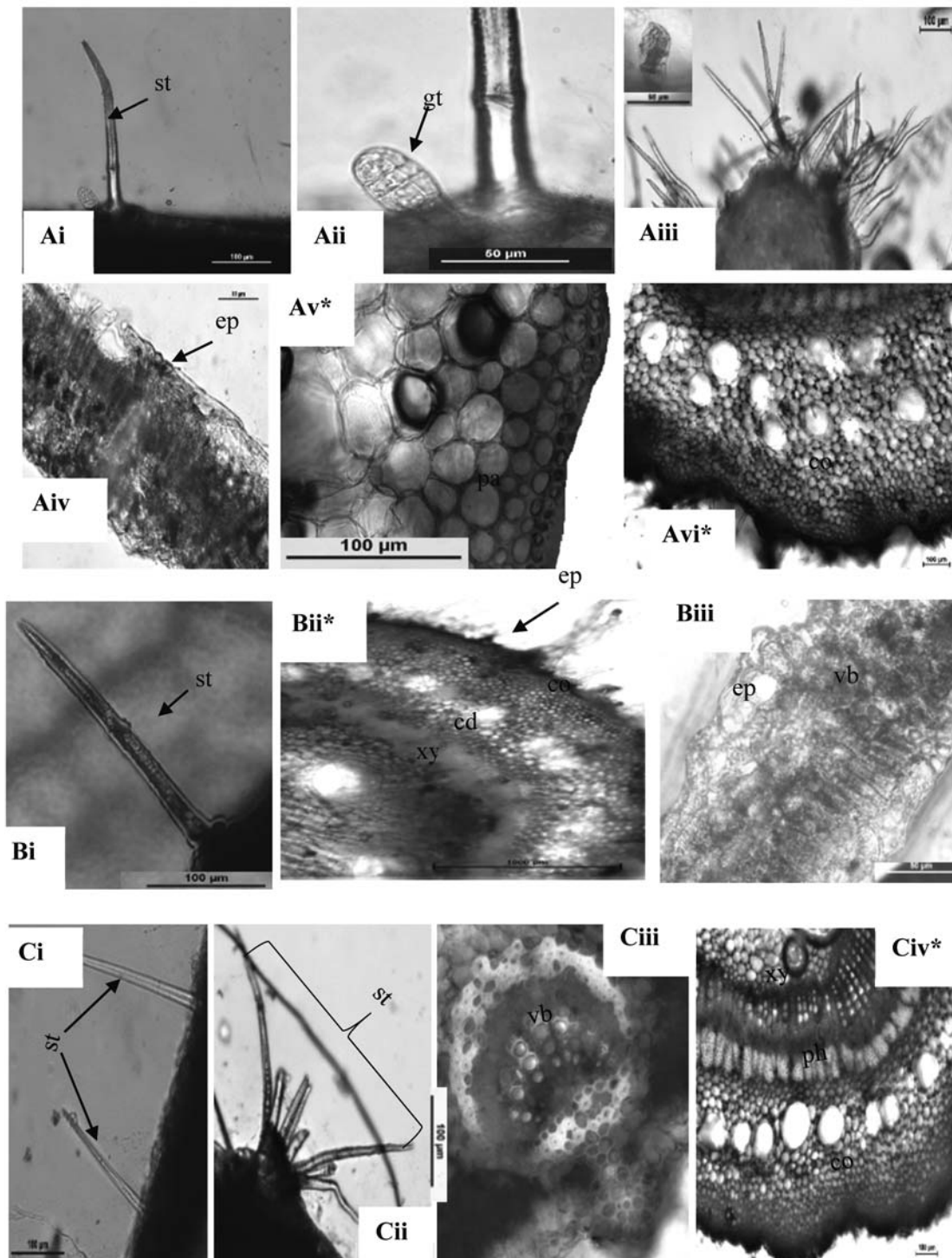
FIGUUR 13 (A & B): Dwarssnee (TEM) van 'n volwasse blaar van *Grewia lasiocarpa*. (pyle) provakuole, (V) vakuole, (N) nukleus, (L) lipiedruppels, (P) plastiede met korrels, (ovaal) gebied van sel-selkommunikasie, (asterisks) tilakoïede.



FIGUUR 14 (A–C): Die ultrastruktuur van (A) ontluikende, (B) jong, (C) volwasse blare, (asterisks) plastiede.

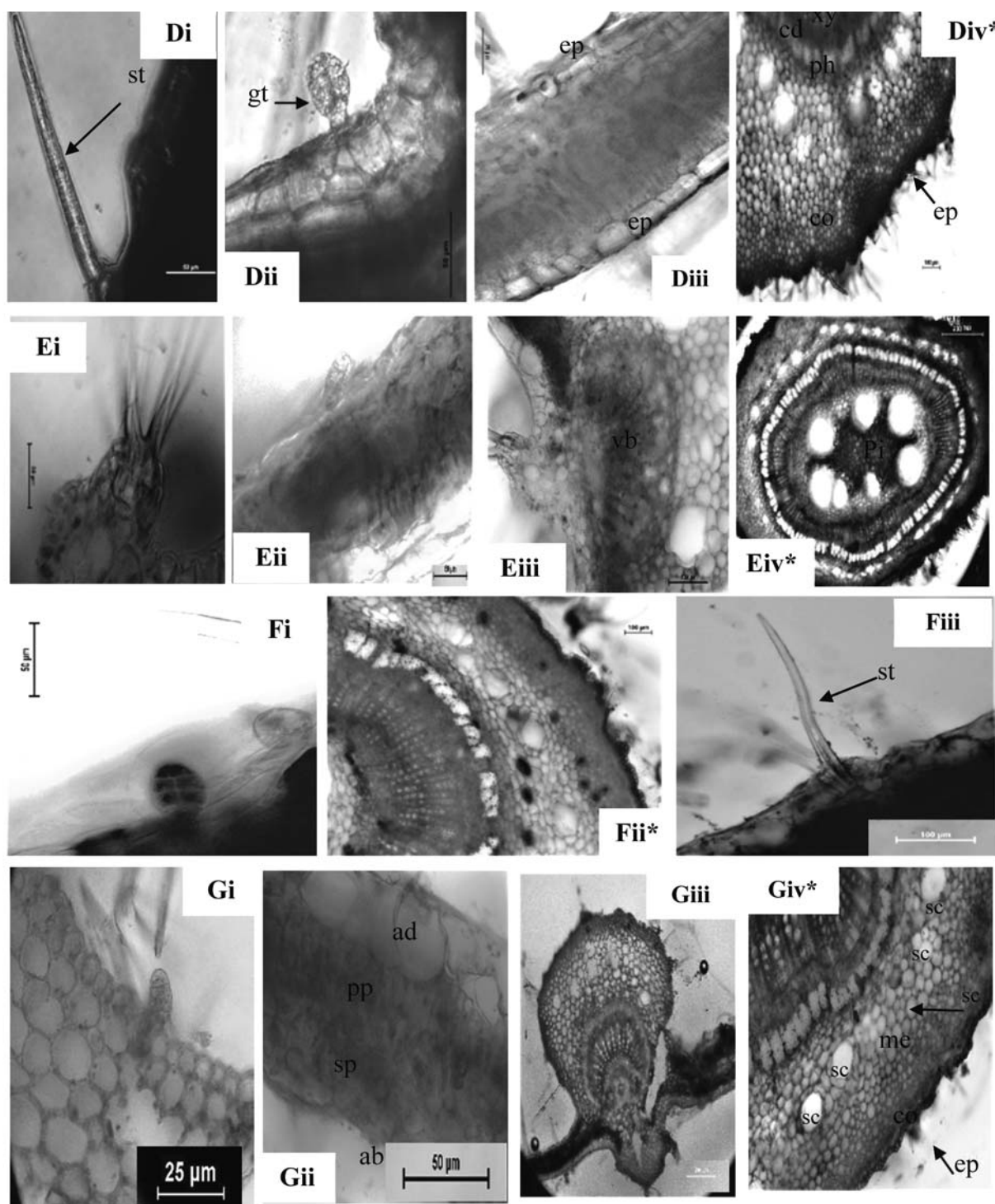
Die trigome (klieragtig en nieklieragtig) is gelignifiseer (fig. 15Ai en ii) en suuragtig (fig. 15Aiii), terwyl die epidermisselle (adaksiaal en abaksiaal), vaatbondels (xileem en floëem) en parenkiemselle van die hoofaar, die korteks van die stingelbas ook gelignifiseer is. 'n Positiewe reaksie (rooi) is waargeneem met die behandeling met 1-naftol en N, N-dimietiel-fenileendiamien-reagens wat die aanwezigheid van harsagtige suur in die nieklieragtige trigome aandui (fig. 15Bi); xileem, kambium, korteks, en epidermisselle (fig. 15Bii); vaatbondels (fig. 15 Biii). Die nieklieragtige trigome (fig. 15Ci en ii) het rooi gekleur vir neu-

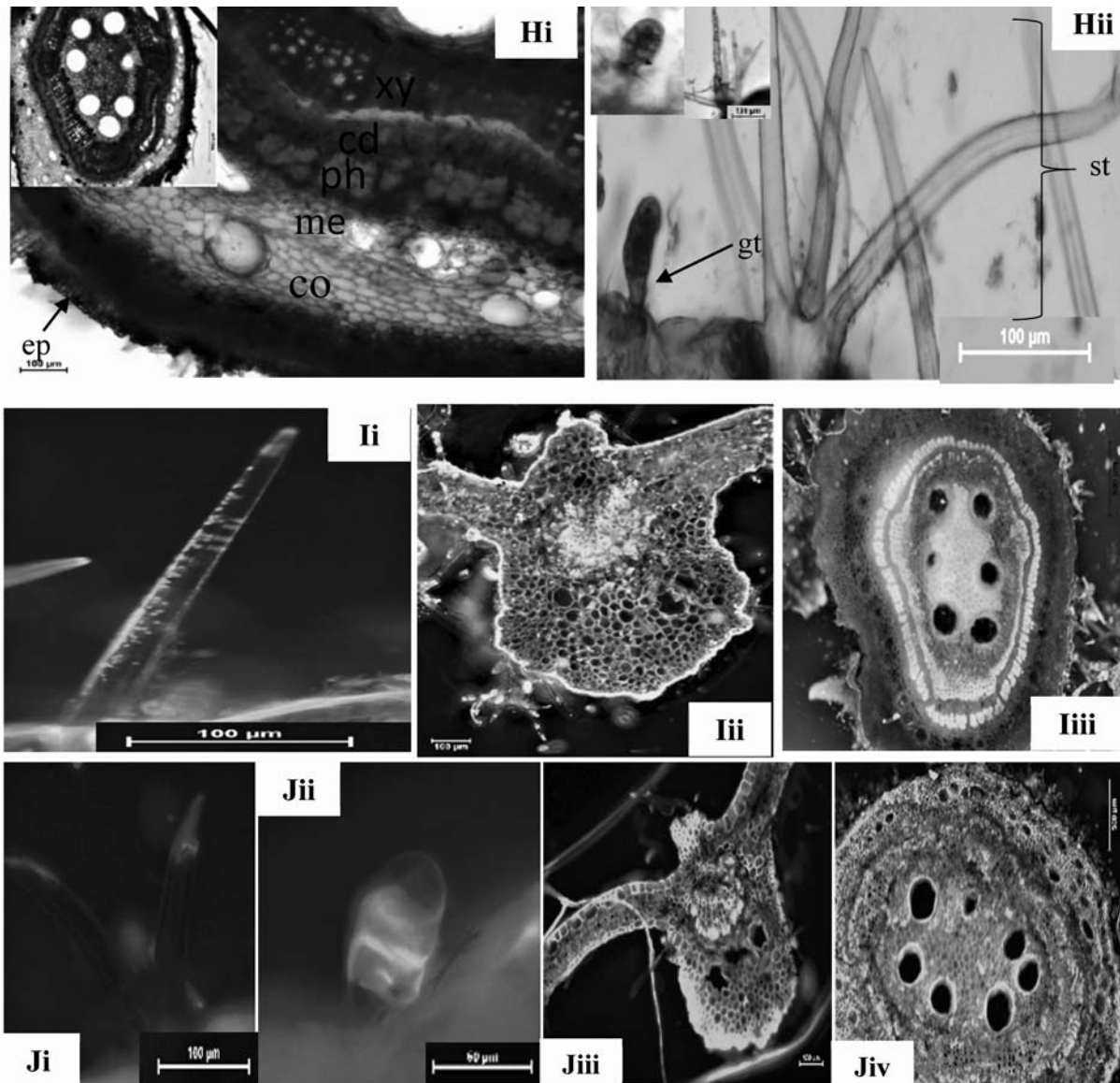
trale sure en blou vir suurhars soos in fig. 15Cii-iv sigbaar is, d.i. sommige nieklieragtige trigome, vaatbondels, xileem, floëem, korteks. Suuragtige polisakkariede is teenwoordig in die trigome, epidermisselle, korteks, floëem, xileem en kambium soos deur die ruthemiumrootoets aangedui word (fig. 15Di-iv). Die jodiumtoets het swart verkleuring getoon by die kutikula van al die nieklieragtige en klieragtige trigome (fig. 15Ei en ii), met die vaatbondel en murg wat ook swart gekleur het. Kleuring met ferrichloried het 'n positiewe reaksie gegee in die gesekreterde stof in die klieragtige trigome (fig. 15Fi), wat



die neerlegging van ortodihydroksifenole in die klieragtige trigome, korteks, floëem en xileem bevestig (fig. 15Fii). Die teenwoordigheid van proteïene in die strukturele trigome word in fig. 15Fiii bevestig. Die Sudan-toetse bevestig verder die teenwoordigheid van lipiedinsluitings in bykans alle dele van die blare en stingelbas (fig. 15Gi-iv). Die floëem van die stingelbas het oranje gekleur terwyl ander onderdele bruin gekleur het met Wagner se reagens, wat die teenwoordigheid van alkaloiëde bevestig (fig. 15Hi), terwyl die knobbelvormige en strukturele trigome bruin gekleur het (fig. 15Hii).

Volgens die fluoressensiemikroskopies het die nieklieragtige en klieragtige trigome 'n diffuse/intense en sterk outofluoressensie onder UV-eksitasie getoon. Die DNS wat met die fluoressente kleurstof acridienoranje gekleur is, se diffuse fluoressensie het getoon dat DNS in die nieklieragtige trigome teenwoordig is soos respektiewelik aangedui in fig. 15Ii en fig. 15Iii van die lewende selle. Calcofluorwit het 'n intense blou fluoressensie in die selwande van die nieklieragtige trigome (fig. 15Ji) en die klieragtige trigome, veral rondom die steel en basaal selle (fig. 15Jii) van die blare en stingelbas veroorsaak.





FIGUUR 15 (A-J): Strukturele en histochemiese karakterisering van *Grewia lasiocarpa*.

(Ai, ii, iv, v, vi) lignien kleur blou met toluïdienblou, (Aiii) aangesuurde lipiede kleur rooi-bruin met toluïdienblou (inlas toon klieragtige trigoom); (Bi-vii) harsure kleur rooi met NADI-reagens; (Ci-ii) neutraal en (Cii-iv) suuragtige lipiede kleur onderskeidelik rooi en blou met nylblou; (Di-iv) suuragtige polisakkariede soos slym en pektien kleur rooi of ligroos; (Ei-iv) styssel kleur swart met jodium; (Fi en ii) ortodihidroksifenole kleur swart met ferritrichloried; (Fiii) alle proteiene kleur blou met kwikbroomfenolblou; (Gi-iv) lipiedinsluitings kleur rooi met Sudan iii en iv; (Hi en ii) alkaloiëde kleur bruin of oranje met Wagner se reagens [inlas toon volledige sneë van stingelbas wat die alkaloiëde neerslae en 'n ander klieragtige trigoom aandui]; (Ii-iii) DNS gekleur met fluoressente acridienoranje; (Ji-iv) sellulose kleur blou met fluoressente calcofluorwit (st) strukturele trigome, (ad) adaksiale oppervlak, (ab) abaksiale oppervlak, (gt) klieragtige trigome, (pp) palissadeparenchium, (sc) sekresiesiel, (sp) sponsagtige parenchium, (me) mesofil, (pa) parenchium, (pi) pit, (vb) vaatbondel, (cd) kambium, (co) korteks, (ph) floëem, (xy) xileem. Al die sneë is van blare, behalwe waar anders met 'n asterisk aangedui.

Bespreking

Hierdie ondersoek het op drie ontwikkelingsstadiums van die blare gefokus, naamlik ontvou, jonk en volwasse. Die aantal hoofare op die blare varieer van drie na vyf en strek vanaf die ronde of gelobde basis; hierdie waarneming stem ooreen met die verslag van Boon en Pooley (2010). Gomme kom in die blare (epikutikulêr) en in die growwe, grys, harige, stingelbas van *G. lasiocarpa* voor. Strukturele en klieragtige trigome kom op die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* voor. Dit is bekend dat klieragtige trigome spesifieke metaboliese prosesse uitvoer soos absorpsie van nutriënte, biosintese en uitskeiding van stowwe soos slym,

verteringsensieme, soute, sekondêre metaboliete vir beskerming (alkaloiëde, tanniene), asiellipiede en nektar (Lange & Turner 2013; Naidoo *et al.* 2014).

Die adaksiale en abaksiale oppervlaktes van die ontlukende en jong blare is dig behaar terwyl die trigome op die volwasse blare baie minder is (fig. 4C i en ii). Boon & Pooley (2010), dui aan dat die volwasse stingelbas van *G. lasiocarpa* tipies glad, grys en harig is, en met ons waarneming ooreenstem, terwyl die stingelbas van *G. mollis* grof, harig en swart is (Martins *et al.* 2008). Die stingelbas van *G. lasiocarpa* is dig met trigome bedek. Soos by ander *Grewia* spp. byv. *G. huluperakensis*, *G. polygama*, *G. multiflora*,

uitgesonderd *G. laevigata* (Chung 2002), kom enkelvoudige, strukturele en gespesialiseerde klieragtige trigome ook op beide oppervlaktes van die blare van *G. lasiocarpa* voor. Strukturele (nieklieragtige) en klieragtige trigome is op die stingelbas van *G. lasiocarpa* waargeneem.

Ongeveer ses hoofstipes met subtipes strukturele trigome is op die blare en stingelbas waargeneem. Chung (2002) vermeld die teenwoordigheid van hierdie trigome op ander *Grewia* spp., behalwe die veelstralig-stervormige trigome met talle arms en sentrale kussings asook die veelhoekige trigome. Ibrahim *et al.* (2018), verwys ook na hierdie trigome en die T-vormige trigome. Stervormige trigome is waargeneem op die buitekantse deel van die kelkblare van *G. lasiocarpa* (Boon & Pooley 2010). Stervormige trigome kom ook voor op die blare van *G. villosa* (Kumar & Paul 2015) asook *G. asiatica* (Joshi *et al.* 2013) en hul vrugte (Parul *et al.* 2013).

Hoewel skildvormige trigome nie deur Chung (2002) genoem word nie, is slegs een soort sittende, skildvormige trigoom op die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* waargeneem. Gebaseer op uitwendig strukturele kenmerke is drie tipes kort, eensellige gesteelde, knuppelvormige trigome waargeneem, saam met meersellige, geronde klierkoptrigome, meersellige elliptiese klierkop- of meersellig en langwerpige klierkoptrigome. Die knuppelvormige trigome is ook deur Chung (2002) by *G. occidentalis*, *G. huluperakensis*, *G. multiflora*, *G. laevigata* en *G. polygama* waargeneem. Die teenwoordigheid van volop nieklieragtige en klieragtige trigome op die hoof- en syare, teenoor die skaarsheid op die blaarlamina, kan toegeskryf word aan die funksionele rol van voedsel- en watervervoer wat deur die vaatweefsel verrig word (Rao 2009). 'n Molekulêre seinstroom mag vir die apikaalgerigte, knuppelvormige trigome verantwoordelik wees.

Weens die digharige voorkoms van die trigome op die ontlukende en jong blare, is slegs volwasse blare vir trigoom- en stomata-indekse geëvalueer om te vergelyk met ander *Grewia* spp. waaroor daar verslag gelewer is. Die epidermisselle grens aan die opvallende stomas se kutikulêre striasies. Chung (2002) het bevind dat anomotiese stomas die hoofstomatipe is van die *Grewia* spp. wat hy ondersoek het, en dat anisotiese en parasitiese tipes minder algemeen was. In teenstelling met ons bevindings is slegs parasitiese stomas in die epidermis van die blare waargeneem (Fig. 8A). Soos met *G. polygama* (Chung 2002), is die stomas op die volwasse blare amfistomaties, dit is stomas op beide kante van die blaar. Hoewel (Chung 2002) nie die presiese blaaroppervlak spesifiseer wat ondersoek is nie, was die persentasie stomatêre indekse van die adaksiale en abaksiale oppervlaktes grootliks dieselfde as die indeksomvang soos deur Chung (2002) gerapporteer. Die gerapporteerde omvang was tussen 11.3 en 29, met 'n gemiddeld van 14.1 in *G. laevigata* en 25.9–27.3 in *G. multiflora* en *G. polygama*.

Hoewel die trigoomdigtheid op die ontlukende en jong blare nie bepaal is nie, ondersteun die mikrofoto's die verslag van Werker (2000), waarin vermeld word dat die aanleg van die trigome 'n aanvang neem voor die aanleg van die blaarprimordiums, dit is die gebied waar die blare ontwikkel, en ook voor stomatêre ontwikkeling. Dit beteken dat die trigome gevorm is voor blaarontluking.

Die gemiddelde aantal stomas per mm² op die adaksiale vlak van die volwasse blare se epidermis is laer as die van die abaksiale vlak, en hierdie waarneming strook met die bevindings van Hunsche *et al.* (2010) vir *G. tenax*. Maar Hunsche en sy kollegas (2010) vermeld nie die staat van ontwikkeling van die blare wat hulle ondersoek het nie. Hierdie verskil in getalle mag die gevolg wees van een van die funksionele rolle van plantstomas, naamlik die vermindering van die transpirasietempo, wat deur hitte en lugvloei veroorsaak word (Royer 2001). Verder was die trigoomindeks ook hoër op die adaksiale as die abaksiale vlak. Dit kan die gevolg wees van omgewingsfaktore soos hitte en lugvloei omdat 'n toename in enige van hierdie faktore die normale fisiologie van die plantselle sal wysig. Oor die algemeen sal die teenwoordigheid van trigome help om die hitte-effek van sonlig en die transpirasietempo te verminder, asook die blare teen ander eksterne biotiese faktore te beskerm. Hierdie waarnemings kan ook moontlik verklaar word na aanleiding van die geografiese ligging van die *G. lasiocarpa*-plant wat vir hierdie studie gebruik en in 'n misgordelwoud met ondergrondse waterbron naby die kus voorkom – vandaar die behoefte vir meer stomas en trigome op die adaksiale as die abaksiale vlak vir sistematiese behoud van die osmotiese en turgordruk in die selle deur die interaksie tussen die plant en die omgewing.

In die blare en stingels van plante wat tot die familie Malvaceae behoort, is 'n slymagtige epidermis en droes-kristalle die hoofmikroskopiese diagnostiese kenmerke (Molares en Ladio 2014; Ibrahim *et al.* 2018). 'n Slymagtige epidermis en tanniene is ook teenwoordig in sommige korteksselle (felleemagtige laag).

Verder is antiklinale, en nie periklinale selwandverdelings van die epidermisselle in die blare waargeneem nie, wat ook vir ander *Grewia* spp. gerapporteer is (Chung 2002). In die volwasse blare van *G. lasiocarpa* kom aansienlik hoër aantal lipieddruppels voor wat in grootte varieer omdat die kleiner lipieddruppels saamsmelt om die groter druppels te vorm. Die lipiede is die produk van hormoonmetabolisme, die reaksie op spanning, en weerstand teen patogene (Chapman *et al.* 2012). Hierdie hoër getal impliseer dat *G. lasiocarpa* 'n hoër olieinhoud bevat en moontlik ook verskeie metaboliete wat gebruik kan word om sekere patogene siektes mee te behandel.

Die variasie in intensiteit van die blare se groen tussen die ontlukende, jong en volwasse blare (fig. 1A–C), kan as

gevolg van die aantal plastiede per sel wees. Dit korreleer met die TEM-mikrofoto's wat 'n toename in die getal tilakoïede aandui in volgorde van ontluikend < jonk < volwasse – daarom vertoon die volwasse blare 'n donkerder groen.

Gebaseer op ons bevindings skei klieragtige trigome beskermende sekondêre metaboliete soos ortodihidroksi-fenole, alkaloiëde, lipiede en lignien af. Die teenwoordigheid van suuragtige lipiede wat sulfiede bevat (Sridharan en Shankar 2012) is in die strukturele en klieragtige trigome bevestig. Acridienoranje, 'n metachromatiese fluorochroom, kleur DNS fluoesserend groen en ribonukleïensuur (RNAs) oranje. Daarom kan die rooi gebiede 'n aanduiding wees van die teenwoordigheid van endofitiese bakterieë of van suuragtige organelle, en die opvallende groen kolle die endofitiese fungi (Guzaev *et al.* 2017).

Gevolgtrekking

Twee tipes klieragtige trigome kom op die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* voor. Daar kom egter verskeie tipes trigome voor met die enkelvoudige trigome die volopste. Die teenwoordigheid van klieragtige trigome op die blare en stingelbas van *G. lasiocarpa* dui aan dat dit 'n plantsoort is met ekologiese, ekonomiese en medisinale waarde. Hierdie is die eerste verslag aangaande die mikromorfologie, histochemie en ultrastruktuur van die blare, stingelbas en haarkleed (indumentum) van *Grewia lasiocarpa* E. Mey. ex Harv.

Dankbetuigings

Die outeurs bedank die *Organisation for Women in Science for the Developing World* (OWSD) en die *Swedish International Development Cooperation Agency* hartlik vir hulle finansiële, intellektuele en materiële bydraes. Hiermee saam is die outeurs baie dankbaar teenoor die Universiteit van Kwa-Zulu-Natal, die Eenhede vir Mikroskopie en vir Mikro-analise, UKZN, Westville, Durban wat die tegniese hulp en ondersteuning verleen het vir die duur van hierdie projek.

Verwysings

- Agostini CTS, Vieira RF, Bizzo HR, Silveira D, Gimenes MA. 2012. Secondary metabolites in chromatography and its applications. Sasikumar Dhanarasu. InTech.
- Akwu NA, Naidoo Y, Singh M. 2019. A comparative study of the proximate, FTIR analysis and mineral elements of the leaves and stem bark of *Grewia lasiocarpa* E. Mey. ex Harv.: An indigenous southern African plant. *S Afr J Bot.* 123:9-19.
- Akwu NA, Naidoo Y, Singh M, Nundkumar N, Lin J. 2019. Phytochemical screening, *in vitro* evaluation of the antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potentials of *Grewia lasiocarpa* E. Mey. ex Harv. *S Afr J Bot.* 123:180-192.
- Ascensão L, Pais M. 1987. Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Botanical Gazette.* 148(2):221-227.
- Bantho S, Naidoo Y, Dewir Y. 2020. The secretory scales of *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae): Micromorphology, ultrastructure and histochemistry. *S Afr J Bot.* 131:104-117.
- Baser KHC. 1995. Analysis and assessment of essential oils: In A Manual on the Essential Oil Industry. UNIDO, Vienna Austria. Edited by KT De Silva.
- Bayer C, Kubitzki K. 2003. Malvaceae. Flowering Plants · Dicotyledons. Springer, pp. 225-311.
- Boon R, Pooley E. 2010. Pooley's trees of eastern South Africa. Flora and Fauna Publications Trust.
- Bornman C, Spurr A, Addicott F. 1969. Histochemical localisation by electron microscopy of pectic substances in abscising tissue. *JS Afr Bot.* 35:253-264.
- Bozzola JJ, Russell LD. 1999. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Jones & Bartlett Learning.
- Cain A. 1947. The use of Nile blue in the examination of lipoids. *J Cell Sci.* 3(3):383-392.
- Chapman KD, Dyer JM, Mullen RT. 2012. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. *J Lipid Res.* 53(2):215-226.
- Chung R. 2002. Leaf epidermal micromorphology of *Grewia* L. and *Micracos* L. (Tiliaceae) in Peninsular Malaysia and Borneo. *Gard Bull, Singapore.* 54:263-286.
- Chung R. 2005. Revision of *Grewia* (Malvaceae–Grewioideae) in Peninsular Malaysia and Borneo. *Edinburgh Journal of Botany.* 62(1-2):1-27.
- David R, Carde J. 1964. Histochemie-coloration differentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif NADl. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences.* 258(4):1338-&.
- Furr M, Mahlberg PG. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *J Nat Prod.* 44(2):153-159.
- Gabe M. 1968. Techniques histologiques. Paris: Masson.
- Guzaev M, Li X, Park C, Leung W-Y, Roberts L. 2017. Comparison of nucleic acid gel stains cell permeability, safety, and sensitivity of ethidium bromide alternatives.
- Hanaichi T, Sato T, Iwamoto T, Malavasi-Yamashiro J, Hoshino M, Mizuno N. 1986. A stable lead by modification of Sato's method. *Microscopy.* 35(3):304-306.
- Hunsche M, Bürling K, Saied AS, Schmitz-Eiberger M, Sohail M, Gebauer J, Noga G, Buerkert A. 2010. Effects of NaCl on surface properties, chlorophyll fluorescence and light remission, and cellular compounds of *Grewia tenax* (Forssk.) Fiori and *Tamarindus indica* L. leaves. *Plant growth regulation.* 61(3):253-263.
- Ibrahim ZM, Hassan SA, El-Azab HM, Badawi A. 2018. Cladistic analysis of some taxa in Malvaceae sl "Core Malvales" based on anatomical characteristics. *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany).* 14(1):87-105.
- Jensen WA. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice San Francisco: WH Freeman and Co.
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique Mc. Graw-Hill Book Co Inc New York and London 511pp.
- Johnson CT. 1990. A preliminary checklist of Xhosa names for trees growing in Transkei. *Bothalia.* 20(2):147-152.
- Joshi P, Pandya P, Priya DL. 2013. Pharmacognostical and Phytochemical Evaluation of *Grewia asiatica* Linn (Tiliaceae) Fruit Pulp and Seed. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive.* 4(2):333-336.
- Khalid H, Abdalla WE, Abdelgadir H, Opatz T, Efferth T. 2012. Gems from traditional north-African medicine: medicinal and aromatic plants from Sudan. *Natural products and bioprospecting.* 2(3):92-103.
- Kim HJ, Han JH, Kim S, *et al.* 2011. Trichome density of main stem is tightly linked to PepMoV resistance in chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Theor Appl Genet.* 122(6):1051-1058.
- Kumar A, Paul T. 2015. *Grewia villosa* Willdenow (Malvaceae): a new record from Eastern India. *Pleione.* 9(1):240-243.
- Lange BM, Turner GW. 2013. Terpenoid biosynthesis in trichomes—current status and future opportunities. *Plant Biotechnol J.* 11(1):2-22.
- Lison L. 1960. Histochemie et cytochemie animales, vol. V/II Paris: Gauthiers-Villars.
- Martin FW, Ortiz S. 1967. Staining paraffin-embedded plant tissues with acridine orange. *Stain Technology.* 42(5):231-235.
- Martins E, Christiana I, Olobayo K. 2008. Effect of *Grewia* gum on the mechanical properties of paracetamol tablet formulations. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2(1):001-006.
- Mitra PP, Loqué D. 2014. Histochemical staining of *Arabidopsis thaliana* secondary cell wall elements. *Journal of Visualized Experiments* (87).
- Molares S, Ladio AH. 2014. Plant anatomy in ethnobotanical research: micrographic techniques and applications. *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology.* Springer; 321-333.
- Morton J. 1987. Phalsa. Fruits of warm climates Julia Morton, Miami, FL.276-277.
- Naidoo Y, Heneidak S, Kasim N, Baijnath H. 2011. Morphology, developmental ultrastructure and ultracytochemistry of staminal hairs in *Bulbine inflata* (Asphodelaceae) in relation to function. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants,* 206(12):1069-1075.

- Naidoo Y, Kasim N, Heneidak S, et al. 2013. Foliar secretory trichomes of *Ocimum obovatum* (Lamiaceae): micromorphological structure and histochemistry. *Plant Systematics and Evolution*, 299(5): 873-885.
- Naidoo Y, Heneidak S, Bhatt A, et al. 2014. Morphology, histochemistry, and ultrastructure of foliar mucilage-producing trichomes of *Harpagophytum procumbens* (Pedaliaceae). *Turkish Journal of Botany*. 38(1): 60-67.
- Nep EI, Odumosu PO, Ngwuluka NC, et al. 2013. Pharmaceutical properties and applications of a natural polymer from *Grewia mollis*. *Journal of Polymers*. 2013.
- Parul J, Preeti P, Priya DL. 2013. Pharmacognostical and Phytochemical Evaluation of *Grewia asiatica* Linn Tiliaceae Fruit Pulp and Seed. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*. 4(2):333-336.
- Payne WW. 1978. A glossary of plant hair terminology. *Brittonia*. 30(2):239-255.
- Raghu K, Naidoo Y, Dewir Y. 2019. Secretory structures in the leaves of *Hibiscus sabdariffa* L. *S Afr J Bot*. 121:16-25.
- Rao IM. 2009. Essential plant nutrients and their functions. Vol. 209. Colombia: International Center for Tropical Agriculture.
- Roland J, Vian B. 1991. General preparation and staining of thin sections. *Electron microscopy of plant cells*. London: Academic Press; p. 1-66.
- Royer D. 2001. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Rev Palaeobot Palynol*. 114(1-2):1-28.
- Salisbury E. 1928. I. On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora. *Phil Trans R Soc Lond B*. 216(431-439):1-65.
- Sankhyan H, Mariappan N, Bawa R. 2008. Morphological variations in *Grewia laevigata* Vahl in Shiwalik hills of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Forestry (India)*.
- Spurr AR. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*. 26(1-2):31-43.
- Sridharan G, Shankar AA. 2012. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*. 16(2):251.
- Stace CA. 1965. Cuticular studies as an aid to plant taxonomy. *Bull Brit Mus(Nat Hist) Bot*. 4(1):3-78.
- Svoboda KP, Svoboda TG, Syred A. 2000. Secretory structures of aromatic and medicinal plants. Powys, UK, Microscopix.
- Wahlert GA, Phillipson PB, Lowry PP. 2015. A new species of *Grewia* L. (Malvaceae, Grewioideae) from northeastern Madagascar. *Candollea* 70(2), 201-205.
- Weber M. 1992. The formation of pollenkitt in *Apium nodiflorum* (Apiaceae). *Ann Bot*. 70(6):573-577.
- Werker E. 2000. Trichome Diversity and Development-II. Trichome Variability and Classification-A. Non-glandular Trichomes. *Advances in Botanical Research*. 31,6.