La relation structure-activité d'analogues de rhynchosporosides. II. Etude comparée de leur activité biologique

Pierre Auriol, Delphin Rafenomananjara, Christian Mazars

► To cite this version:

Pierre Auriol, Delphin Rafenomananjara, Christian Mazars. La relation structure-activité d'analogues de rhynchosporosides. II. Etude comparée de leur activité biologique. *Agronomie*, 1983, 3 (4), pp.349-353. hal-00884519

HAL Id: hal-00884519

<https://hal.science/hal-00884519>

Submitted on 1 Jan 1983

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

La relation structure-activité d'analogues de rhynchosporosides.

II. Etude comparée de leur activité biologique.

Pierre AURIOL, Delphin RAFENOMANANJARA (*) & Christian MAZARS

Université Paul-Sabatier, Centre de Physiologie végétale, Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 241, 118, route de Narbonne, F 31062 Toulouse Cedex.

(*) Station Marine, BP 141, Tulear, Madagascar.

RÉSUMÉ

Certains analogues structuraux de rhynchosporosides présentent une toxicité discriminante vis-à-vis de lignées d'orge sensible et résistante à la rhynchosporiose. La toxicité de ces molécules est corrélative de leur affinité pour des protéines membranaires des plantes hôtes. L'expression de ces deux propriétés biologiques repose sur la présence, dans ces molécules, de caractéristiques structurales ; l'anométrie α de la liaison ose-aglycone, présente dans les rhynchosporosides naturels, apparaît comme le facteur prépondérant d'une plus forte toxicité.

Mots-clés additionnels : Toxicité, Affinité membranaire, Anométrie α .

SUMMARY

*The structure-activity relationship of rhynchosporoside analogs.
II. Comparative study of biological activity.*

Synthetic analogs structurally related to rhynchosporosides had a differential toxicity on barley lines resistant and susceptible to *Rhynchosporium secalis*. The toxicity of these molecules is correlated with their affinity for host plant membrane proteins. Some structural features were needed for biological activity ; an α -linkage between sugar and aglycone moieties — as in the natural phytotoxins — was the factor inducing the highest toxicity.

Additional key-words : Toxicity, Membrane affinity, α -linkage.

I. INTRODUCTION

Les rhynchosporosides constituent une famille de toxines sélectives produites *in vitro* (BEIER, 1979) et *in vivo* (MAZARS, 1982) par *Rhynchosporium secalis* (Oud.) Davis, agent de la rhynchosporiose de l'orge. Nous avons réalisé la synthèse chimique d'analogues de deux d'entre elles : le glucoside et le cellobioside (RAFENOMANANJARA *et al.*, 1983).

La recherche de relations existant entre la structure d'une molécule et son activité est une constante très actuelle de l'expérimentation en biologie. Son application au domaine des phytotoxines fongiques ou bactériennes est relativement rare. On peut cependant relever les résultats obtenus dans cette optique sur la tentoxine (RICH *et al.*, 1978 ; RICH *et al.*, 1979), les toxines d'*Alternaria mali* LEE *et al.*, 1976 ; IZUMIYA *et al.*, 1979) et surtout la fusicoccine (BALLIO, 1977, 1982). Comme le fait remarquer cet auteur (BALLIO, 1982), l'utilisation d'un dérivé naturel ou de synthèse d'une phytotoxine peut présenter un grand intérêt en permettant de définir (a) le système cible qui interagit de manière initiale avec la toxine ; (b) les caractéristiques d'un tel système ; (c) les propriétés moléculaires de la substance active, conformation incluse, indispensable à cette interaction.

C'est le but que nous avons, en partie, poursuivi ici pour mieux apprécier le rôle des rhynchosporosides dans l'établissement de cette maladie en complétant des données déjà publiées (PIO BELTRAN *et al.*, 1980) sur la relation entre la structure et l'activité de ces phytotoxines.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Matériel biologique

Deux variétés d'orge, présentant chacune une lignée sensible à *Rhynchosporium secalis* et une lignée résistante, ont été utilisées dans ce travail :

Betzes CI 6398 (S) et Betzes (Rivale/7 Betzes) (R)

Betzes $\times$ Pirolina, lignée naturelle Tr 501 (S) et Betzes $\times$ Pirolina (Turk/7 Tr 501) (R)

Les plantes sont obtenues par culture hydroponique en conditions contrôlées (MAZARS, 1982).

B. Estimation de la toxicité des analogues

Nous avons utilisé le bioessai déjà retenu (AURIOL *et al.*, 1978) pour l'étude de ces toxines. Chaque plant d'orge, âgé

de 8 jours est, après section au-dessus du sol, introduit dans un tube à essai contenant 2 ml de la solution à tester ; la quantité de chaque analogue a été de 20 μg ; l'absorption de la solution est facilitée par le flux de transpiration de la plante. Les conditions climatiques sont les suivantes : température : 23°C ; intensité lumineuse : 5000 lux ; durée d'éclairement journalier : 14 h.

Pour estimer l'action toxique des composés testés, nous avons retenu sur la durée des expériences, soit 7 à 8 j., la notation des symptômes proposée par SCHEIN (1958) pour des organes infectés. Cette notation est la suivante :

0 : pas de symptôme.

1 : petites lésions gris-vert au sommet des feuilles.

2 : lésions au sommet et marginales, typiques de l'échaudage.

3 : augmentation de la taille de ces lésions, apparition d'une chlorose.

Pour les notations 2 et 3 on observe souvent un flétrissement initial de quelques heures suivi d'une reprise de turgescence. Les bioessais ont été effectués avec 3 répétitions et les résultats présentés sont une moyenne des notes attribuées indépendamment par 2 expérimentateurs, d'où la modulation présente (+ ou -) des valeurs de l'échelle de notation. Les différents analogues testés ont été les glucosides de 2-0-propanediol (G-La), de 2-0-isopropanol (G-P₂), de 1-0-n-propanol (G-P₁) et de 1-0-n-butanol (G-Bu). Le même type d'abréviation a été employé pour les cellobiosides (C-La ; C-P₂ ; C-P₁ et C-Bu).

C. Purification de protéines d'association de rhynchosporiosides

1. Obtention d'une préparation membranaire brute. Nous avons retenu le protocole expérimental préconisé par STROBEL (1973).

2. Purification des protéines d'association par chromatographie d'affinité. La colonne d'affinité (1,5 $\times$ 18 cm) a été préparée selon FORNSTEDT & PORATH (1975) dans les conditions adaptées par PIO BELTRAN & STROBEL (1978), exception faite de la matrice du support qui est ici de l'Epoxy-activated Sepharose 6 B (Pharmacia Fine Chemicals) ; le ligand utilisé a été le cellobiose.

La colonne ainsi préparée est rincée par 150 ml de tampon Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4. On introduit alors la préparation membranaire brute ; on rince ensuite la colonne par 150 ml du même tampon. L'élution des protéines retenues s'effectue par passage (40 ml/h) de 250 ml d'une solution de cellobiose 50 mM dans le même tampon. La totalité de l'éluat est collectée et lyophilisée. Le lyophilisat est repris par 35 ml du même tampon et dialysé pendant 3 j contre 20 l de ce tampon.

D. Essai d'appréciation de l'affinité analogues-protéines membranaires

Les analogues de synthèse dont nous disposons ne sont pas radioactifs ; les quantités de protéines membranaires obtenues après chromatographie d'affinité sont faibles ; il était donc difficile de suivre la fixation éventuelle de ces analogues à ces protéines par une mesure directe. Nous avons donc tenté une mesure indirecte qui a consisté à saturer en glucose U¹⁴C (activité spécifique 300 mCi n.mole⁻¹ ; origine C.E.A.) ces préparations protéiques et à observer le déplacement de ce glucose par des analogues dans des conditions de dialyse à l'équilibre.

Cet essai a été réalisé de la manière suivante : 30 ml d'une solution de protéines membranaires purifiées (provenant d'organes sensible et résistante) contenant 60 μg de protéines dosées selon la méthode de LOWRY *et al.*, (1951) modifiée par BENSADOUN & WEINSTEIN (1976) sont mis en contact avec 360 μl d'une solution de glucose U¹⁴C (29 nmoles, 7,25 μCi) ; l'incubation se poursuit 4 h à 4°C. La solution protéines-glucose est dialysée 12 h contre 1 l de tampon Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4 ; dans ces conditions, l'équilibre association-dissociation est fortement déplacé par la dilution au 1/30^e imposée par la dialyse, ce qui déplace le glucose en excès vers le compartiment de dialyse. 10 ml de cette solution sont alors introduits dans un flacon que l'on obture par une membrane de dialyse ; le flacon est immergé dans 20 ml du même tampon et on laisse la dialyse se poursuivre pendant 20 h ; ceci se traduit par une nouvelle sortie de glucose jusqu'à stabilisation par apparition d'un plateau qui semble donc indiquer que l'équilibre association-dissociation entre ces protéines et le ligand est atteint. On ajoute alors (instant T₀) dans les 20 ml de tampon de dialyse 25 μl d'une solution de l'analogue à tester (soit 8-10⁻⁸ mole) et on prélève toutes les heures (instants T), pendant 4 h, 100 μl du compartiment externe de dialyse dont on mesure la radioactivité (PACKARD 282 A, avec correction de Quenching). Dans ces conditions expérimentales, il apparaît donc que tout déplacement éventuel de glucose sous l'action d'un analogue indiquera, pour cet analogue, une affinité plus forte que celle du glucose vis-à-vis de ces protéines.

Les incubations avec les analogues ont été réalisées à basse température (0-4°C).

III. RÉSULTATS

A. Toxicité des analogues de synthèse

1. Activité des glucosides

Les résultats obtenus apparaissent dans le tableau 1. Les analogues β sont sans effet toxique apparent sur la lignée résistante « Betzes $\times$ Pirolina » ; ils sont faiblement actifs, après un délai minimum de 5 j, sur la lignée sensible. Les analogues α sont légèrement toxiques sur la lignée résistante ; cet effet est faible mais net comparativement à l'absence de réaction observée avec les β -glucosides. Sur la lignée sensible, ces analogues sont plus actifs ; en effet les symptômes sont décelés plus tôt et on observe une généralisation de l'action toxique qui reste cependant limitée. Les faibles effets toxiques apparents des α et β glucosides de synthèse varient donc en fonction (a) de la résistance ou de la sensibilité de l'orge à la rhynchosporiose ; (b) de l'anomérisation, les dérivés α présentant, dans la grande majorité des cas, une plus forte activité ; (c) de la nature de l'aglycone, les dérivés à propanediol et à isopropanol étant les plus toxiques.

2. Toxicité des cellobiosides

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 2. Deux β -cellobiosides, C-P₂ et C-P₁, sont faiblement actifs vis-à-vis de la lignée résistante ; seuls C-La et C-P₂ sont légèrement actifs sur plantes sensibles. C-Bu est toujours inactif.

Les 4 α -cellobiosides testés sont légèrement toxiques sur des plantes résistantes. Ils sont tous actifs sur la lignée sensible et cela d'une manière précoce. Pour 2 d'entre eux, C-La et C-P₂, l'accentuation des symptômes initiaux est très

TABLEAU 1

Effets de l'absorption d' α et de β -glucosides sur des plantes sensibles (S) et résistantes (R) de la variété « Betzes $\times$ Pirolina »
Effects of α and β -glucosides uptake on susceptible (S) or resistant (R) plants of « Betzes $\times$ Pirolina » variety

Analogue		GLa		GP ₂		GP ₁		G-Bu	
Temps en jours		S	R	S	R	S	R	S	R
1	α	1	0	1	1	1(-)	1	1(-)	0
	β	0	0	0	0	0	0	0	0
3	α	1	0	1	1	1(-)	1	1(-)	0
	β	0	0	0	0	0	0	0	0
5	α	1	1	1	1	1	1	1(-)	0
	β	1	0	1(+)	0	0	0	0	0
7	α	1(+)	1(+)	1(+)	1(+)	1(+)	1	1	0
	β	1	0	1(+)	0	1(+)	0	1(-)	0

TABLEAU 2

Effets de l'absorption d' α et de β -cellobiosides sur des plantes sensibles (S) et résistantes (R) de la variété « Betzes $\times$ Pirolina »
Effects of α and β -cellobiosides uptake on susceptible (S) or resistant (R) plants of « Betzes $\times$ Pirolina » variety

Analogue		CLa		CP ₂		CP ₁		CBu	
Temps en jours		S	R	S	R	S	R	S	R
1	α	1	0	1(-)	1(-)	1(-)	1	1	0
	β	0	0	0	0	0	0	0	0
3	α	1(+)	1(-)	1(+)	1(-)	1(-)	1	1	0
	β	1(-)	0	1(-)	1(-)	0	1(-)	0	0
5	α	2	1(-)	2	1(-)	1	1	1(+)	1(-)
	β	1(-)	0	1	1(-)	0	1(-)	0	0
7	α	3	1(+)	3	1(-)	1(+)	1	1(+)	1
	β	1(+)	0	1(+)	1(+)	0	1	0	0

marquée puisqu'ils conduisent à une chlorose prononcée des feuilles.

L'activité toxique comparée des α et β -cellobiosides peut, ici aussi, être analysée en fonction (a) de la sensibilité et de la résistance ; (b) de l'anomérisation des dérivés α sont dans tous les cas les plus phytotoxiques ; (c) de la nature de l'aglycone ; ici encore les dérivés à propanediol et à isopropanol sont les plus efficaces.

B. Affinité des analogues de synthèse

Dans une 1^{re} série d'expériences, nous avons utilisé les analogues β -G-P₂, et β -C-P₂ et des protéines membranai-

res extraites des lignées sensible et résistante de la variété « Betzes $\times$ Pirolina ». Les résultats obtenus ont été schématisés dans la figure 1. Dans le but de les rendre comparables (entre plantes résistante et sensible), nous les avons exprimés selon le rapport :

$$\frac{\text{dpm à T} - \text{dpm à To}}{\text{dpm à To}} \times 100$$

En ce qui concerne la préparation membranaire issue de plantes sensibles, on observe que la présence du β -glucoside n'entraîne qu'un faible déplacement du glucose vers le milieu extérieur ; ce déplacement est stimulé par le β -cellobioside et il est fortement augmenté par l' α -cellobioside.

Figure 1

Evolution du pourcentage de radioactivité (%) en glucose radioactif déplacé par α -C-P₂ (▲.....▲); β -C-P₂ (●-----●) et β -G-P₂ (■——■) depuis des préparations membranaires de plantes sensible (S) et résistante (R).

Changes of the percentage (%) of labeled glucose displaced by α -C-P₂ (▲.....▲); β -C-P₂ (●-----●) and β -G-P₂ (■——■) from susceptible (S) and resistant (R) plants membrane preparations.

Dans le cas de la préparation protéique venant de plantes résistantes, le β -glucoside déplace très faiblement le glucose; les 2 cellobiosides augmentent légèrement et de manière égale ce déplacement.

La compétition avec le glucose est donc d'autant plus nette que la préparation protéique est extraite de plantes sensibles et que l'analogue mis en jeu est l' α -cellobioside C-P₂. Ce type de corrélation recouvre parfaitement celui qui avait pu être établi entre la toxicité de ces analogues et leur structure chimique.

Dans une 2^e série d'expériences, nous avons utilisé des protéines membranaires issues de lignées sensible et résistante de la variété « Betzes ». Nous avons obtenu des résultats similaires de déplacement de glucose, mais il a été parfois observé un rappel de glucose dans le compartiment protéique.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

De l'ensemble des résultats obtenus par la mise en contact d'analogues structuraux de 2 rhynchosporosides,

soit avec des plantes d'orge sensible et résistante, soit avec des protéines membranaires qui en sont issues, peuvent être déduites certaines conclusions.

Il apparaît tout d'abord que quelques analogues peuvent être phytotoxiques au même titre que les composés naturels eux-mêmes. Cette activité biologique s'exprime d'autant mieux :

- qu'ils agissent sur une lignée d'orge sensible à la maladie et non sur une lignée résistante ;
- qu'ils appartiennent à la série α des anomères considérés ;
- que leur partie glucidique est du cellobiose,
- qu'ils présentent un aglycone qui est soit le propane-1,2-diol soit l'isopropanol rattachés au glucose par leur carbone 2.

Il ressort par ailleurs une similitude assez nette entre la toxicité de ces molécules et leur affinité vis-à-vis de protéines membranaires des plantes hôtes ; nos résultats indiquent en effet que l'affinité était d'autant plus marquée que le composé s'est révélé plus toxique ; à cet égard, nous avons observé que des composés non toxiques (maltose, cellobiose) ne déplaçaient pas le glucose lié aux protéines membranaires. Cependant, il est probable que les paramètres qui contrôlent cette affinité soient relativement complexes ; ainsi les cas où nous avons observé (avec une variété d'orge différente) une fixation augmentée de glucose consécutivement à une fixation de l'analogue, suggèrent des phénomènes de coopérativité positive (C. MAZARS, rapport de D.E.A., 1980) ; l'éventualité à ce niveau d'un enrichissement en glucose du milieu d'incubation par dégradation enzymatique des analogues semble peu probable dans la mesure où les incubations sont réalisées entre 0 et 4°C. En outre, dans un cas semblable de fixation d'une toxine osidique, l'helminthosporoside, sur des protéines membranaires, il a pu être montré que la concentration en protéines (KENFIELDS & STROBEL, 1980), la composition lipidique membranaire (KENFIELD & STROBEL, 1981 a), l'âge de la plante (KENFIELD & STROBEL, 1981 b) sont autant de facteurs qui influent sur cette affinité de liaison.

Les données apportées par ce travail corroborent et complètent des informations obtenues par ailleurs sur le mécanisme d'action des rhynchosporosides.

Il a été en effet démontré (PIO BELTRAN & STROBEL, 1978) que le rhynchosporoside 3 (cellotrioside α -1-10 propane-1,2-diol) peut s'associer à des protéines membranaires d'orge ; cette liaison est beaucoup plus efficace avec les protéines isolées à partir de plantes sensibles. L'un d'entre nous (MAZARS, 1982) vient très récemment de montrer que cette relation d'affinité différentielle existe aussi pour le rhynchosporoside 1 (glucoside) et le rhynchosporoside 2 (cellobioside) et ceci tant *in vitro* qu'*in vivo*.

En tout état de cause, l'anomérisation α et la présence dans la molécule de propane-1,2-diol — deux caractéristiques moléculaires des rhynchosporosides naturels — semblent les facteurs primordiaux d'efficacité pour l'association toxine-récepteur protéique et, en conséquence, pour l'expression de toxicité.

PIO BELTRAN *et al.*, (1980) ont eux aussi réalisé la synthèse, par voie enzymatique, de l'analogue α -2-0 du rhynchosporoside 2 et constatent qu'il est toxique sur une variété d'orge sensible (« Hannchen » CI 531) ; ces Auteurs concluaient donc que la position du carbone d'attache (2-0 ou 1-0) n'est pas une condition *sine qua non* à l'expression de toxicité. Par ailleurs, des résultats récents obtenus dans notre laboratoire (C. MAZARS, soumis pour publication) indiquent que, soit la nature de cette liaison, soit la nature

de l'aglycone peuvent présenter une importance biologique très poussée. Ainsi les rhynchosporosides 1 et 2 à liaison α 1-0 sont des activateurs du dégagement d'oxygène photosynthétique alors que les analogues de synthèse à liaison α ou β , 2-0 à un aglycone voisin du propanediol sont totalement inactifs sur ce phénomène. Seuls les rhynchosporosides naturels sont donc munis de l'ensemble des caractéristiques structurales nécessaires à la totalité de l'expression toxique : la reconnaissance membranaire et l'action activatrice sur les chloroplastes. Nous poursuivons actuellement nos recherches pour apprécier quelles sont, de ces poten-

tialités liées à des caractéristiques structurales, celles qui sont indispensables au déterminisme, par les rhynchosporosides, de l'interaction *Rhynchosporium secalis*-*Hordeum vulgare*.

Reçu le 14 septembre 1982.

Accepté le 2 décembre 1982.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement R. ESLICK (Montana State University, Bozeman, Montana U.S.A.) qui nous a fourni les variétés d'orge utilisées dans ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Auriol P., Strobel G., Pio Beltran J., Gray G., 1978. Rhynchosporoside a host selective toxin produced by *Rhynchosporium secalis*, the causal agent of scald disease of barley. *Proc. natl. Acad. Sci., USA*, **75**, 4339-4343.
- Ballio A., 1977. Fusicoccin : structure activity relationships. p. 217-223. In: E. Marre & O. Ciferri. *Regulation of cell membranes activities in plants*. Elsevier, Amsterdam, 340 p.
- Ballio A., 1982. Structure-activity relationships. p. 395-441. In R.D. Durbin. *Toxins in plant disease*. Academic Press. N.Y., Londres, Toronto, Sydney et San Francisco, 515 p.
- Beier R.C., 1979. *Carbohydrate chemistry. Synthetic and structural investigations of the phytotoxins found in Helminthosporium sacchari and Rhynchosporium secalis*. Ph. D. Thesis, Montana State University, Bozeman, Montana, 263 p.
- Bensadoun A., Weinstein D., 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.*, **70**, 241-250.
- Fornstedt N., Porath J., 1975. Characterization studies on a new lectin found in seeds of *Vicia ervilia*. *FEBS Lett.*, **57**, 187-191.
- Izumiya N., Kato T., Aoyagi H., Waki M., Kondo M., 1979. Synthetic aspects of biologically active cyclic peptides. p. 123-143. Wiley ed. N.Y.
- Kenfield D.S., Strobel G.A., 1980. Inverse relationship between protein concentration and binding activity of alpha-galactoside receptors from sugarcane membranes. *Biochem. biophys. Acta*, **600**, 705-712.
- Kenfield D.S., Strobel G.A., 1981 a. Selective modulation of helminthosporoside binding by alpha-galactoside-binding proteins from sugarcane clones susceptible and resistant to *Helminthosporium sacchari*. *Physiol. Plant Pathol.*, **19**, 145-152.
- Kenfield D.S., Strobel G.A., 1981 b. The status of a toxin receptor in sugarcane leaves in relationship to toxin sensitivity and leaf age. *Biochem. Int.*, **2** (23), 249-256.
- Lee S., Aoyagi H., Shimohigashi Y., Izumiya N., Ueno T., Fukumi H., 1976. Synthesis of cyclotetradepsipeptides, AM-toxin and its analogs. *Tetrahedron Lett.*, 843-846.
- Lowry D.H., Rosenbrough N.J., Farre A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Mazars C., 1982. *Approche biochimique du rôle des rhynchosporosides dans l'interaction parasitaire Rhynchosporium secalis-Hordeum vulgare*. Thèse Spécialité, Physiol. végét., Toulouse, 71 p.
- Pio Beltran J., Strobel G.A., 1978. Rhynchosporoside binding proteins of barley. *FEBS Lett.*, **96**, 34-36.
- Pio Beltran J., Strobel G.A., Beier R., Mundi B.P., 1980. Some synthetic phytotoxins structurally related to rhynchosporoside. *Plant Physiol.*, **65**, 554-556.
- Rafenomananjara D., Auriol P., Mazars C., 1983. La relation structure-activité d'analogues de rhynchosporosides. I. Synthèse chimique. *Agronomie*, **3** (4), 349-353.
- Rich D.H., Bhatnagar P., Jasensky R.D., Steele J.A., Uchytel T.F., Dubin R.D., 1978. Two conformations for the cyclic tetra peptide [D-Me-Ala¹]-tentoxin have different biological activities. *Bioorg. Chem.*, **7**, 207-214.
- Rich D.H., Bhatnagar P.K., Bernatowicz M.S., 1979. Multiple conformations of Sar⁻ tentoxin. Correlation of conformation with inhibition of CF₁-ATPase. p. 349-352. In Z. Siemion & G. Kupryszewski. *Peptides 1978*. Wroclaw Univ. Press, Pologne.
- Shein R.D., 1958. Pathogenic specialization in *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology*, **48**, 477-480.