

**AFPP – 6^e CONFÉRENCE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS DE PROTECTION
POUR UNE PRODUCTION INTÉGRÉE
LILLE – 21, 22 ET 23 MARS 2017**

**ETUDES DES POTENTIALITES DE NOUVELLES BIOMOLECULES POUR LA PROTECTION DES PLANTES
EN AGRICULTURE BIOLOGIQUE
LES PROJETS PHYTOBIO ET SMARTBIOCONTROL**

A. ARGUELLES^a, F. KRIER^b, F. COUTTE^b, V. LECLERE^b, S. LEMIERE^c, M. HOFTE^d, M. ONGENA^a, E. AIT
BARKA^e, S. DOREY^e, C. JACQUARD^e, N.G. KHONG^f, B. TISSERANT^f, B. RANDOUX^f,
Ph. REIGNAULT^f, L. DELANOTE^g, N. CAP^h, P. JACQUES^{a,b}

a: Terra Research Centre, Microbial Processes and Interactions (MiPI), University of Liège -
Gembloux Agro-Bio Tech, B-5030 Gembloux, Belgium

b: Charles Viollette Institute, ProBioGEM team, University of Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq,
France

c: LGCGE, University of Lille1, F- 59655 Villeneuve d'Ascq, France

d: Department of phytopathology, University of Ghent, 9000 Ghent, Belgium

e: Laboratory of plant stress, defence and reproduction, URVVC-EA 4707, University of
Reims Champagne-Ardenne, F-51687 Reims cedex 2, France

f : Univ Littoral Côte d'Opale, EA 4492 – UCEIV - Unité de Chimie Environnementale et
Interactions sur le Vivant, SFR Condorcet FR CNRS 3417, F-62228 Calais cedex, France

g: Inagro, B-8800 Rumbeke-Beitem, Belgium

h: PCG – Vegetable Research, B-9770 Kruishoutem, Belgium

RÉSUMÉ

A travers le projet Interreg PHYTOBIO, et plus récemment le nouveau portefeuille de projets SMARTBIOCONTROL, 26 partenaires issus de laboratoires universitaires, de centres de recherche ou d'instituts techniques agricoles, ont décidé de mettre leurs compétences au service de la découverte de nouvelles biomolécules. Ces dernières, essentiellement des lipopeptides, sont capables de lutter efficacement, et de façon durable, contre une gamme de maladies les plus importantes des cultures. Dans le cadre du projet PHYTOBIO, une dizaine de molécules produites par les genres bactériens *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Burkholderia* ont pu montrer, dans des expériences menées *in vitro* et *in vivo* à la fois en serres et aux champs, l'énorme potentiel de ces métabolites bactériens amphiphiles en tant qu'agents de biocontrôle. Leur variabilité en lien avec la biodiversité microbienne conduit au constat que de nombreux autres lipopeptides efficaces sont encore à découvrir.

Mots-clés: Lipopeptides, Biocontrôle, Antifongique, Résistance systémique induite, Molécules amphiphiles.

ABSTRACT

Through the Interreg PHYTOBIO project and more recently the new project portfolio SMARTBIOCONTROL, 26 partners from university laboratories, research centers or agricultural technical institutes decided to gather their skills for the discovery of new biomolecules, mainly lipopeptides, capable to control efficiently, and in a sustainable manner, a range of most important crop diseases. In the PHYTOBIO project, a dozen molecules produced by the bacterial genera *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Burkholderia* showed, *in vitro* and *in vivo* both in greenhouse and field conditions, the high potential of these amphiphilic bacterial metabolites as biocontrol agents. Their variability linked to bacterial biodiversity led to the finding that many other efficient natural molecules remain to be discovered.

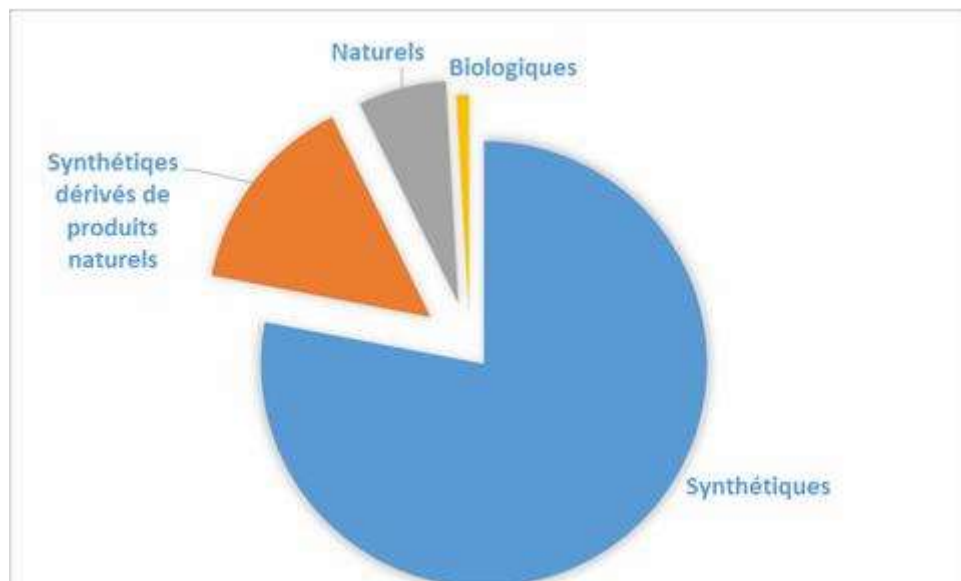
Keywords: Lipopeptides, Biocontrol, Antifungal, Induced Systemic Resistance, Amphiphilic compounds.

INTRODUCTION

La lutte contre les maladies des plantes impose l'usage de nombreux intrants d'origine chimique et fait face à une quasi absence de produits biologiques efficaces. En effet, il s'avère que sur les 109 nouveaux pesticides enregistrés auprès de l'agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA) de 1997 à 2010, 78% sont d'origine synthétique, 15% sont des pesticides de synthèse dérivés de produits naturels et seuls 0.9% sont d'origine biologique, les 6.4% restant étant des produits naturels (Fig. 1) (Cantrell *et al.*, 2012).

Figure 1 :
Nouveaux pesticides enregistrés de 1997 à 2010 par l'Environmental Protection Agency (EPA) groupés par origine (Cantrell *et al.*, 2012).

New pesticides registered by the Environmental Protection Agency (EPA) from 1997 to 2010 organized by source (Cantrell *et al.*, 2012).



En agriculture conventionnelle, l'utilisation de certains de ces pesticides représente un réel danger pour la santé humaine en particulier celle de l'agriculteur confronté à de fortes concentrations du produit lors de sa dispersion. Ces produits ont également un effet sur l'environnement voire sur la flore naturelle bénéfique pour les plantes. Il est donc primordial de diminuer de manière drastique leur utilisation. Depuis quelques années, de nombreuses initiatives politiques dans plusieurs pays européens tendent à réduire l'utilisation de ces pesticides mais malheureusement, le manque d'alternatives naturelles et moins toxiques semble encore très grand. Par ailleurs, en agriculture biologique, l'absence de biopesticides empêche le développement économique de ces productions, qui peinent à trouver leur place sur le marché.

Afin de répondre aux attentes des agriculteurs, la mise sur le marché de molécules naturelles biodégradables et moins toxiques que les molécules actuellement utilisées est une piste prometteuse. Ainsi, les lipopeptides produits par des bactéries du genre *Bacillus* ou *Pseudomonas*, entre autres, sont de bons candidats pour répondre à cette problématique (Ongena et Jacques, 2008). Dans cette optique, le portefeuille de projets SMARTBIOCONTROL, regroupant 5 projets (BIOCOMGEST, BIOSCREEN, BIOPROD, BIOSENS et BIOPROTECT), initié à la suite du projet PHYTOBIO, s'inspire et se sert des résultats intéressants et prometteurs obtenus dans ce

dernier afin de pouvoir mettre sur le marché des molécules naturelles apportant aux agriculteurs une réelle solution quant à la protection des cultures contre les champignons phytopathogènes. Dans cet article, nous résumerons les principaux résultats obtenus dans le cadre du projet PHYTOBIO et introduirons les objectifs du portefeuille de projet SMARTBIOCONTROL.

MATERIEL ET MÉTHODES

La démarche scientifique du projet PHYTOBIO est reprise dans la figure 2. Une première étape de criblage des molécules potentiellement intéressantes a été réalisée *in vitro*. Une étude basée sur des outils bio-informatiques innovants (Banque de données NORINE (Caboche *et al.*, 2008), workflow FLORINE (Caradec *et al.*, 2014)) a permis, suite à l'analyse du génome de nombreuses souches, d'identifier de nouvelles molécules de nature lipopeptidique produites par des bactéries bénéfiques pour les plantes. Parallèlement, l'effet antagoniste de ces molécules contre différents champignons phytopathogènes a été testé *in vitro* sur boîtes de Petri. Ces deux étapes ont permis de sélectionner et de mettre en évidence des molécules aux propriétés antimicrobiennes qui pourraient ainsi être particulièrement intéressantes en tant qu'agent de biocontrôle.

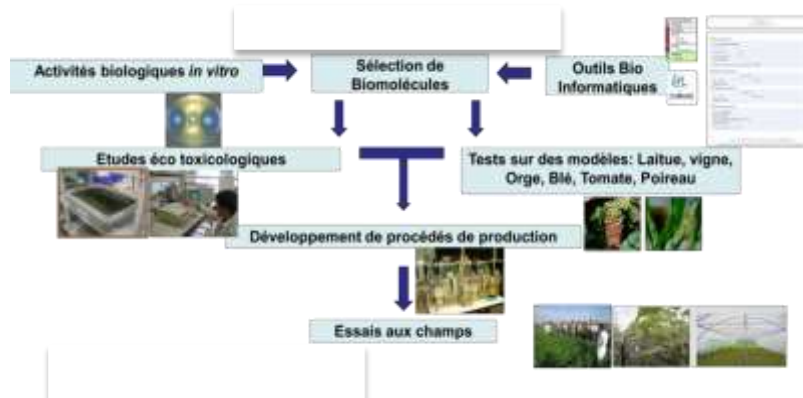
Suite à cette sélection des biomolécules, des tests d'écotoxicité ont permis de démontrer que les molécules sélectionnées étaient particulièrement inoffensives pour la faune (tests MICROTOX et sur Daphnies) et la flore (test de phytotoxicité sur *Lepidium sativum* L). Afin de mieux appréhender l'activité et l'impact sur l'environnement, des études du mode d'action spécifique (activité antifongique et induction de la résistance systémique des plantes (tests sur culture de cellules ou sur feuilles isolées) de ces nouvelles molécules ont été réalisées parallèlement aux études écotoxicologiques. Des essais en conditions contrôlées mais se rapprochant des conditions réelles de culture ont ensuite été réalisés. Des cultures en phytotrons ou en serres de tomate, laitue, vigne, blé, poireau et orge ont été soumises aux différents pathogènes et le niveau de protection de la plante suite au traitement par les nouvelles molécules identifiées précédemment a été évalué.

Une fois toutes ces étapes de sélection et de tests effectuées, une étape de développement de procédés de production de la/des molécules est essentielle, afin de fournir suffisamment de biopesticides pour une montée en échelle et des essais aux champs en conditions réelles. Ainsi la production de ces molécules en bioréacteur à membrane a été étudiée et améliorée afin d'obtenir des rendements de production optimaux.

Enfin, la dernière étape a consisté à tester ces molécules en champs ou en serres dans des conditions réelles sur différents pathosystèmes et à évaluer la réduction de la maladie suite au traitement par les nouvelles biomolécules identifiées, caractérisées et produites dans les étapes précédentes.

Figure 2 :
Représentation schématique de la démarche scientifique du projet PHYTOBIO.

Schematic representation of project PHYTOBIO's scientific approach.



RESULTATS & DISCUSSION

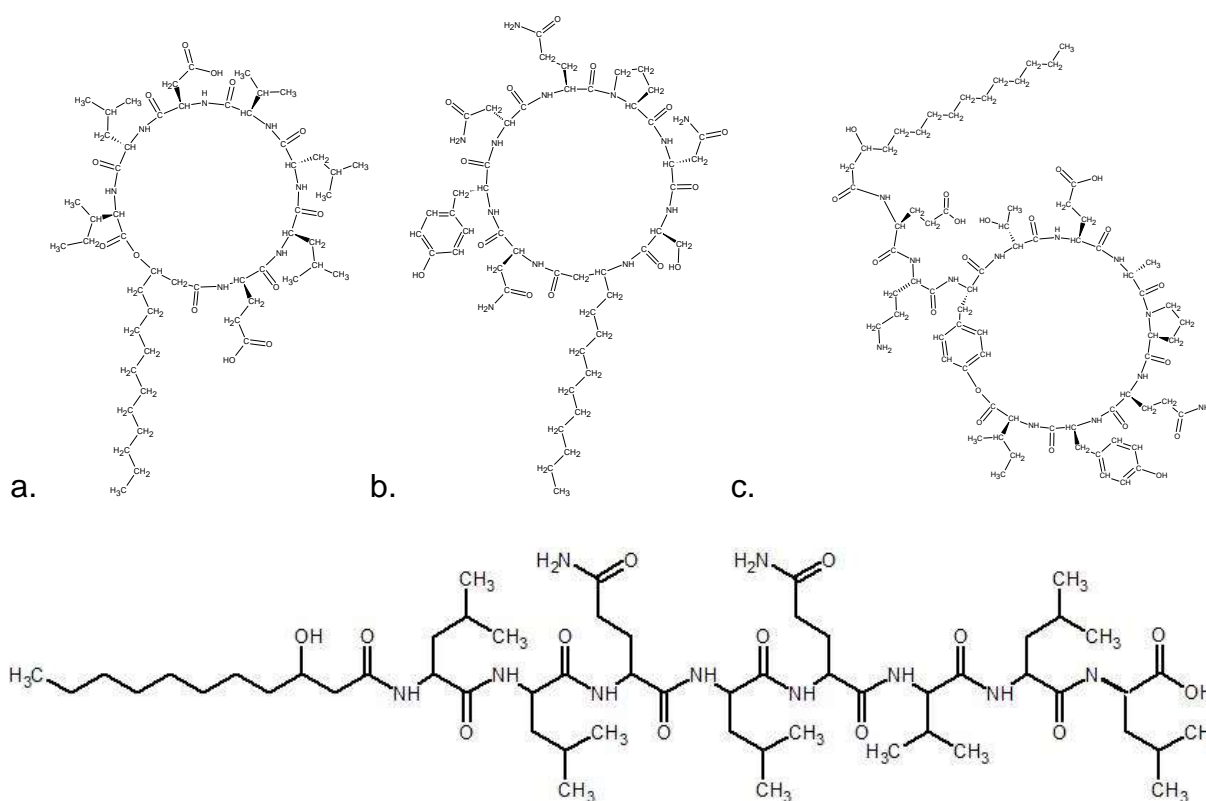
Sélection *in vitro* des molécules actives

Neuf familles de lipopeptides ont été découvertes et/ou étudiées dans le projet. Trois familles sont connues depuis longtemps et produites par *Bacillus subtilis* : les surfactines, les fengycines et les iturines (dont la mycosubtiline) (Figure 3a,b,c). Une quatrième famille, les fusaricidines, est produite par *Paenibacillus polymixa*. Les quatre dernières familles sont produites par des souches du genre *Pseudomonas*. Trois sont entièrement nouvelles, il s'agit des cichofactines (Figure 3d) et des cichopeptides produites par *Pseudomonas cichorii* (Pauwelyn *et al.*, 2013) et de la sessiline produite par *Pseudomonas sp.* CMR12a (D'Aes *et al.*, 2014). Cette dernière souche produit également une nouvelle forme d'orfamide. Enfin une nouvelle famille de lipoglycopeptides produite par *Burkholderia ambifaria* est en cours de caractérisation (Esmael *et al.*, 2016).

Figure 3 :

Structure des molécules sélectionnées et testées dans le projet PHYTOBIO. (a) surfactine, (b) iturine, (c) fengycine, (d) cichofactine

Structure of molecules selected and tested in PHYTOBIO project. (a) surfactin, (b) iturin, (c) fengycin, (d) cichofactin

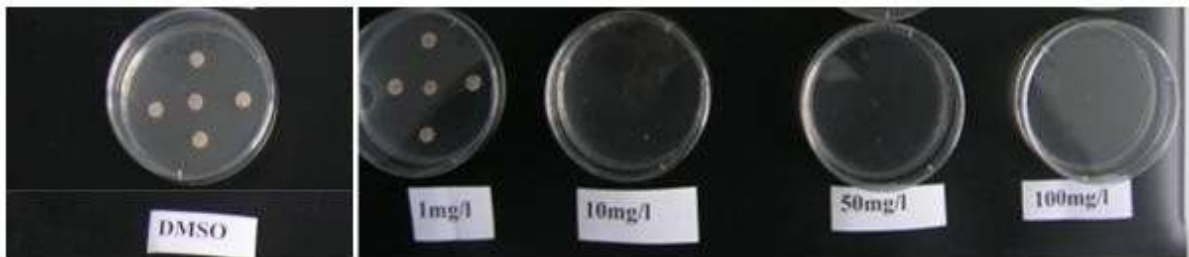


Des tests d'antagonismes direct *in vitro* de ces molécules ont été effectués afin d'évaluer l'effet antimicrobien contre différents phytopathogènes. À titre d'exemple, le pouvoir fongicide, à partir de 10mg/L, de la mycosubtiline vis-à-vis de *Mycosphaerella graminicola*, responsable de la septoriose du blé est particulièrement intéressant (Figure 4).

Figure 4 :

Impact de la mycosubtiline sur la croissance de *Mycosphaerella graminicola* sur boîte de Petri. La mycosubtiline montre une activité antifongique à partir de 10mg/L. L'effet du solvant dans lequel se trouve la surfactine (DMSO) a également été testé et ne montre aucune activité antifongique. L'expérience a fait l'objet de trois répétitions.

Impact of mycosubtilin upon the growth of *Mycosphaerella graminicola* on Petri dishes. Mycosubtilin shows an antifungal activity at 10 mg/L. Solvant effect has been tested and no antifungal activity was detected. The experiment has been repeated three times.



Un test similaire en utilisant les lipopeptides de *Pseudomonas* CMR12a, vis-à-vis d'un autre pathogène, *Rhizoctonia solani*, a donné des résultats similaires. Ces résultats montrent le rôle important des lipopeptides dans la protection des cultures face à différents phytopathogènes.

À la suite des tests *in vitro* montrant le potentiel antimicrobien des molécules sélectionnées, des tests *in vivo* de ces molécules sur différents pathosystèmes ont été entrepris.

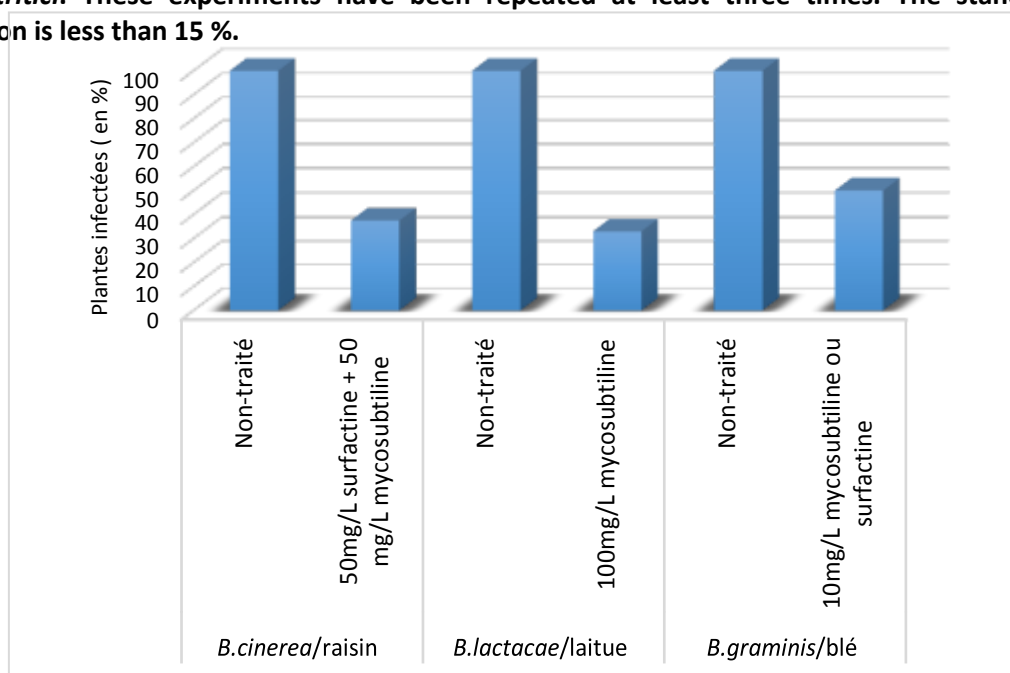
Tests *in vivo* des molécules sur différents pathosystèmes

Les trois familles de lipopeptides produites par *Bacillus subtilis* (mycosubtiline, fengycine et surfactine) ont été testées *in vivo* sur la laitue infectée par l'oomycète *Bremia lactucae*, sur le blé infecté par le champignon *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* ainsi que sur le raisin infecté par *Botrytis cinerea*. L'application de mycosubtiline, d'un mélange de mycosubtiline et de surfactine ou d'un mélange de mycosubtiline et de fengycine a montré un effet protecteur contre *B. lactucae* infectant la salade (Deravel *et al.*, 2014). Concernant le deuxième modèle, une protection moyenne de 50 % a été obtenue de façon reproductible avec la mycosubtiline et la surfactine, utilisées indépendamment, à 10 mg/L. Enfin le mélange surfactine (50 mg/L)-fengycine (50 mg/L) a montré de bons résultats préliminaires de protection des raisins (Figure 5).

Figure 5 :

Activité protectrice des lipopeptides de *Bacillus* dans trois pathosystèmes modèles. Un traitement de grains de raisin infecté par *Botrytis cinerea* par un mélange surfactine/mycosubtiline (50 mg/L surfactine + 50 mg/L mycosubtiline) montre une réduction de la maladie de plus de 50 %. De manière similaire, une solution de 100 mg/L de mycosubtiline induit une réduction de la maladie (plus de 50 %) provoquée par *B. lactucae* sur la laitue. Une dose de 10 mg/L de surfactine ou de mycosubtiline permet une réduction de 50 % de la maladie du blé infecté par *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Ces expériences ont été répétées au minimum trois fois. La marge d'erreur est inférieure à 15%.

In vivo activity of *Bacillus* lipopeptides against 3 pathosystems. A treatment with surfactin (50 mg/L)/mycosubtilin (50mg/L) mixture of infested grape berries with *Botrytis cinerea* shows a disease reduction of more than 50%. Similar results were obtained with a solution of mycosubtilin (100 mg/l) on the disease provoked by *Bremia lactucae* on lettuce. A dose of 10 mg/L of surfactin or mycosubtilin reduced of 50% the wheat disease due to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. These experiments have been repeated at least three times. The standard deviation is less than 15 %.



Ecotoxicité / Etude des mécanismes d'action

La détermination des EC50, paramètre très utilisé pour exprimer l'écotoxicité d'une substance chimique, correspond à la concentration qui entraîne un effet pour 50% des individus exposés. L'écotoxicité des molécules testées apparaît très faible en comparaison avec d'autres substances actives de fongicides chimiques homologuées. À titre d'exemple dans le test Microtox, l'EC50 de la surfactine est supérieure à 450 mg/L alors que cette valeur est de 0,116 mg/L pour le dithianon et 0,152 mg/L pour le captane, deux fongicides de synthèse particulièrement toxiques (Deravel *et al.*, 2014). Le caractère naturel des lipopeptides semble donc particulièrement intéressant. Il est cependant à noter que les premiers tests d'écotoxicité ont été réalisés sur des organismes simples, une étude complète de l'impact sur la flore et la faune reste donc à effectuer.

Les bactéries bénéfiques de la rhizosphère sont connues depuis des années pour leur impact positif sur la bonne santé de la plante à laquelle elles sont associées en agissant à deux niveaux. Premièrement, les bactéries agissent sur la bio-fertilisation rendant les différents éléments nutritifs beaucoup plus facilement accessibles et assimilables pour la plante. Deuxièmement, par son effet de biocontrôle, qui comprend l'antibiose, la souche bénéfique va montrer un effet antagoniste direct envers les pathogènes potentiels de la plante et pourra

également induire une réponse systémique de résistance chez la plante (ISR). En effet, il a été prouvé qu'une plante dont la rhizosphère est colonisée par des bactéries bénéfiques résistait mieux aux attaques de pathogènes infectant d'autres parties de cette même plante.

Dans le but de mieux connaître les molécules sélectionnées, leur mode d'action a été étudié. En particulier, la capacité de colonisation de la rhizosphère de tomates par différentes souches de *Bacillus spp.* a été évaluée. Les souches appartenant à l'espèce *Bacillus amyloliquefaciens* présentent une capacité de colonisation beaucoup plus importante que celle appartenant à l'espèce *Bacillus subtilis*. La surfactine, en utilisant ses propriétés de surfactant, pourrait agir comme agent favorisant la colonisation précoce de la rhizosphère. Ce lipopeptide pourrait donc jouer un rôle dans la capacité de la souche à s'installer plus rapidement sur la rhizosphère des plantes et donc fournir un avantage essentiel dans la compétition pour une niche écologique.

De plus, la capacité des lipopeptides à induire des mécanismes de défense des plantes a été démontré sur cultures cellulaires de tabac, de blé et de vigne (Farace *et al.*, 2015). L'induction de la résistance systémique induite serait également dépendante de la production des lipopeptides présents dans la rhizosphère. Ces résultats démontrent qu'outre l'effet antimicrobien des lipopeptides, ces derniers interviennent aussi à un autre niveau du biocontrôle : l'induction de la résistance de la plante.

Le mécanisme d'action de la surfactine a été étudié en détails. Cette dernière agirait plutôt sur l'organisation de la membrane des cellules végétales que sur un récepteur spécifique. L'utilisation de mutants non producteurs a permis également de démontrer le rôle joué par les différents lipopeptides étudiés chez *Pseudomonas*.

Optimisation de la production des lipopeptides

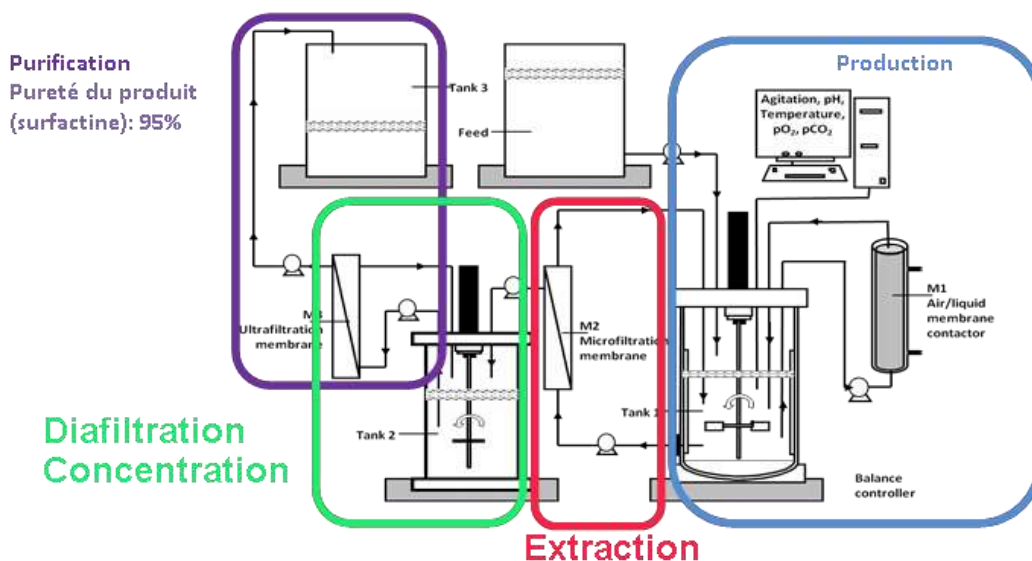
Le but du projet étant d'amener aux agriculteurs une alternative aux pesticides chimiques, il est impératif de pouvoir optimiser la production de ces molécules à l'échelle industrielle. De plus, la plupart des molécules naturelles sur le marché sont dites formulées. En effet l'addition de molécules leur permettant d'améliorer la manutention, l'application, l'efficacité, le stockage, ... est également un point clé dans la production de nouveaux biopesticides.

Les premiers résultats portant sur l'amélioration de la production des lipopeptides de *Bacillus*, notamment par l'utilisation de réacteurs à membranes (Coutte *et al.*, 2013) permettant des cultures en continu sont prometteurs et montrent la faisabilité à plus grande échelle d'un procédé couplant production et purification. Ceci permettra de réduire le coût de production de ces molécules. Le schéma du procédé de production/purification est représenté en figure 6. Ce procédé implique trois étapes intégrées. La première consiste en la production des lipopeptides d'intérêt dans un bioréacteur aéré au moyen d'une membrane. Dans ce réacteur l'absence de bulles dues à l'utilisation d'une membrane pour l'aération limite très fortement la production de mousse. Le contenu de ce bioréacteur est constamment extrait au travers d'une membrane de microfiltration permettant de séparer les substances solubles dans le milieu (comprenant les lipopeptides) des cellules en suspension qui sont donc maintenues dans le bioréacteur. Le filtrat ainsi récupéré est concentré et purifié par diafiltration sur une membrane d'ultrafiltration avec un seuil de coupure de 10000 daltons. Le procédé permet l'obtention dans le rétentat de la diafiltration d'une solution concentrée de lipopeptides avec un degré de pureté pouvant atteindre 95 %.

Figure 6 :

Procédé de production/purification utilisé par PHYTOBIO pour la production des lipopeptides de *Bacillus*.

Process of production/purification used in PHYTOBIO to produce *Bacillus* lipopeptides.



Essais aux champs ou en serres

Les lipopeptides seuls ou en mélange ont été testés en serres et aux champs sur un certain nombre de pathosystèmes. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus sur le pathosystème *Bremia lactucae*/Laitue (Deravel *et al.*, 2014). Ils ont permis de confirmer les premiers résultats obtenus *in vivo* avec la mycosubtiline et le mélange mycosubtiline/surfactine. Un essai préliminaire sur le pathosystème *Fusarium culmorum*/Poireau a également montré des résultats intéressants puisque certains mélanges de lipopeptides ont permis de protéger totalement les plants testés. Cependant le faible niveau d'infection observé chez les témoins nécessite de reproduire l'expérience. Par contre il n'a pas été possible de reproduire les résultats obtenus *in vivo* sur les maladies du blé.

CONCLUSION

La découverte de nouvelles biomolécules en tant qu'alternatives aux pesticides chimiques représente un challenge de taille. Le projet PHYTOBIO a mis en évidence les caractéristiques particulièrement intéressantes de plusieurs biomolécules. Des premiers essais d'écotoxicité, de production/purification à l'échelle industrielle et de tests en champs soulignent tous le potentiel de ces molécules naturelles en tant qu'agent de lutte biologique respectueux de la nature. Des progrès restent cependant à faire pour obtenir un produit susceptible d'être homologué. La formulation des molécules doit être étudiée afin d'espérer obtenir des résultats notamment sur le blé aux champs. La productivité du procédé de production doit être accrue afin d'obtenir un coût de production compétitif. La biodégradabilité des molécules doit être testée et enfin leur efficacité sur un plus grand nombre de pathosystèmes doit être étudiée.

Ces différents challenges ont conduit les partenaires de ce projet PHYTOBIO à proposer au programme Interreg Va, un portefeuille de projet plus ambitieux appelé SMARTBIOCONTROL, pour poursuivre les travaux réalisés et élargir le spectre des activités de

recherche déployées autour de la mise au point et du développement de nouveaux biopesticides. Le portefeuille rassemble 5 projets constitutifs dont les principaux objectifs sont les suivants :

- Bioscreen : développer une plateforme de criblage à haut débit de nouveaux produits de biocontrôle
- Bioprod : optimiser les procédés de production, développer la formulation et étudier la biodégradabilité des composés actifs
- Bioprotect : tester les différents produits disponibles ou en développement sur un grand nombre de pathosystèmes en serres et aux champs, étudier la perception des biopesticides
- Biosens : développer de nouveaux capteurs pour détecter les agents de biocontrôle et les agents pathogènes aux champs
- Biocomgest : assurer la coordination et la communication de l'ensemble du portefeuille.

FINANCEMENT

Cette étude a été réalisée avec le soutien financier d'Interreg IV Projet PHYTOBIO.

BIBLIOGRAPHIE

Caboche S., Pupin M., Leclère V., Fontaine A., Jacques P. and Kucherov G., 2008. NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acid Research*, 36, 326-331.

Cantrell, C. L., Dayan, F. E., and Duke, S. O. n 2012. Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*, 75, 1231–1242.

Caradec T., Pupin M., Vanvlassenbroeck A., Devignes M. D., Smail-Tabbone M., Jacques P. and Leclère V., 2014. Prediction of monomer isomery in Florine: a workflow dedicated to nonribosomal peptide discovery. *PLoS One*, 9, 1-14.

Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., & Dhulster, P., 2013. New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, 48(1), 25-32.

D'aes J., Kieu N.P., Leclère V., Tokarski C., Olorunleke F.E., De Maeyer K., Jacques P., Hofte M. and Ongena M., 2014. To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic 3 lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. *Environmental Microbiology*, 16, 2282-2300.

Deravel J., Lemièrre S., Coutte F., Krier F., Metthey N., Van Hese N., Hofte M., Lepretre A. and Jacques P., 2014. The mixture of mycosubtilin and surfactin, an efficient biocontrol product with low ecotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 6255-6264.

Esmaeel, Q., Pupin, M., Kieu, NP., Chataigné, G., Béchet, M., Deravel, J., Krier, F., Höfte, M., Jacques, P. and Leclère, V. (2016) *Burkholderia* genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis. *MicrobiologyOpen* 5, 512-26

Farace G., Fernandez O., Jacquens L., Coutte F., Krier F., Jacques P., Clement C., Ait Barka E., Jacquard C., Dorey S., 2015. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology*, 16,177-187.

Ongena M. and Jacques P., 2008. *Bacillus* lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiology*, 16: 115-12.

Pauwelyn, E, Huang C.J. Ongena M., Leclère V., Jacques P. Bleyaert, P. Budzikiewicz, H. Schafer, M. and Hofte M., 2013. New linear lipopeptides produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 are involved in virulence, swarming motility, and biofilm formation. *MPMI*, 5, 585-598.