



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114304161 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 12

(21) 申请号 202111416156.4

(22) 申请日 2021.11.25

(71) 申请人 兰州大学

地址 730000 甘肃省兰州市城关区天水南路222号兰州大学

(72) 发明人 刘映前 周勇 杨程杰 贺颖慧  
张保琪 安俊霞 吴争荣 罗雄飞  
马越 张智军 胡勇梅

(51) Int. Cl.

A01N 43/52 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

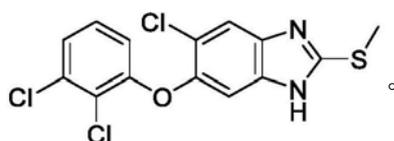
(54) 发明名称

三氯苯达唑在防治农业病原菌中的用途

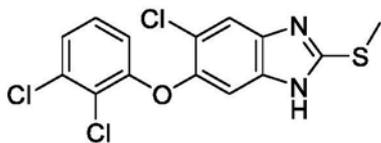
(57) 摘要

本发明属于药物化学领域,公开了三氯苯达唑防治由农业病原细菌水稻白叶枯病病原菌 *Xanthomonas oryzae* ACCC 11602、柑橘溃疡病病原菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citriy* 以及马铃薯黑胫病病原菌 *Pectobacterium atroseptica* ACCC 19901 和农业病原真菌油菜菌核病病原菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia Solani*、小麦赤霉病菌 *Fusarium Graminearum*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、稻瘟病菌 *Magnaporthe Oryzae* 以及辣椒疫霉病菌 *Phytophthora Capsici* 引起的农业病害。三氯苯达唑作为新型农用杀菌剂具有结构新颖、广谱高效的特点,具有进一步研究与开发成新型农用杀菌剂的价值。化合物结构式如下:

CN 114304161 A



1. 本发明涉及三氯苯达唑在抗农业病原菌中的新用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,其中,三氯苯达唑的分子结构特征如下:



3. 根据权利要求1所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治农业病原细菌和农业病原真菌的用途。
4. 根据权利要求1至3所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治水稻白叶枯病中的用途。
5. 根据权利要求1至3所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治柑橘溃疡病中的用途。
6. 根据权利要求1至3所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治马铃薯黑胫病中的用途。
7. 根据权利要求1至3所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治立枯丝核病菌中的用途。
8. 根据权利要求1至3所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治油菜菌核病菌中的用途。
9. 根据权利要求1至3所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治小麦赤霉病菌中的用途。
10. 根据权利要求1至3所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治番茄灰霉病菌中的用途。
11. 根据权利要求1至3所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治稻瘟病菌中的用途。
12. 根据权利要求1至3所述的用途,其中,三氯苯达唑在防治辣椒疫霉病菌中的用途。

## 三氯苯达唑在防治农业病原菌中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物化学领域,公开了三氯苯达唑(Triclabendazole)在防治由农业病原细菌水稻白叶枯病病原菌*Xanthomonas oryzae*、柑橘溃疡病病原菌*Xanthomonas axonopodis* pv.*Citri*以及马铃薯黑胫病病原菌*Pectobacterium atroseptica*和农业病原真菌油菜菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*、立枯丝核菌*Rhizoctonia Solani*、小麦赤霉病菌*Fusarium Graminearum*、番茄灰霉病菌*Botrytis cinerea*、稻瘟病菌*Magnaporthe Oryzae*以及辣椒疫霉病菌*Phytophthora Capsici*引起的植物性病害的新用途。

### 背景技术

[0002] 三氯苯达唑用途广泛,在杀虫方面有着良好的生物活性。对各种日龄的肝片形吸虫均有明显驱杀效果。对牛、绵羊、山羊等反刍动物肝片吸虫,对牛大片形吸虫、鹿肝片吸虫、鹿大片形吸虫、马肝片吸虫等均有效。三氯苯达唑毒性较小,与左咪唑、甲噻嘧啶联合应用时亦安全有效。

[0003] 据调查,全世界对植物有害的病原微生物(真菌、强菌、立克次氏体、支原体、病毒、藻类等)有8万种以上。植物病害已经严重破坏了农业,降低了全世界的农作物产量,并在全世界造成了毁灭性的数百万美元的作物损失。历史上曾多次发生因某种植物病害流行而造成严重饥荒,甚至大量人口饿死的灾祸。随着杀菌剂的长期使用,植物病原真菌对植物病害抗性不断增强,尤其是单一位点的杀菌剂。因此,对高效、环保药剂的需求日益突出。积极发现具有独特作用机制、结构简单、高效的创新型杀菌化学实体可成为现有治疗植物细菌或农业病原真菌药物的更好替代品。

[0004] 在我们课题组前期利用老药新用策略对大量商业化医用药物筛选中发现,三氯苯达唑对多种农业病菌表现出优异的抑制作用。然而目前三氯苯达唑还没有关于抗农业病原菌的活性报道,可以用于新型农用杀菌剂的创新。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供三氯苯达唑在抗农业病原菌中的新用途,用于防治农业病原细菌水稻白叶枯病病原菌*Xanthomonas oryzae*、柑橘溃疡病病原菌*Xanthomonas axonopodis* pv.*Citri*以及马铃薯黑胫病病原菌*Pectobacterium atroseptica*和农业病原真菌油菜菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*、立枯丝核菌*Rhizoctonia Solani*、小麦赤霉病菌*Fusarium Graminearum*、番茄灰霉病菌*Botrytis cinerea*、稻瘟病菌*Magnaporthe Oryzae*以及辣椒疫霉病菌*Phytophthora Capsici*的用途。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供了如下技术方法:

[0007] 三氯苯达唑在抗农业病原菌中的新用途,将三氯苯达唑对农业病原细菌水稻白叶枯病病原菌*Xanthomonas oryzae*、柑橘溃疡病病原菌*Xanthomonas axonopodis* pv.*Citri*以及马铃薯黑胫病病原菌*Pectobacterium atroseptica*的给药浓度为100、50、25、12.5、6.25、3.12 $\mu$ g/mL;对农业病原真菌油菜菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*、立枯丝核菌

Rhizoctonia Solani、小麦赤霉病菌Fusarium Graminearum、番茄灰霉病菌Botrytis cinerea、稻瘟病菌Magnaporthe Oryzae以及辣椒疫霉病菌Phytophthora Capsici的给药浓度是100、50、20、10、5 $\mu$ g/mL。

[0008] 本发明提供的杀菌剂具有以下优势：

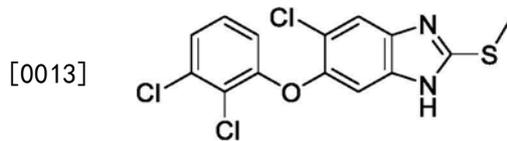
[0009] 1) 本发明首次发现三氯苯达唑对农业病原菌表现出优异的抑制作用，以此为先导模型可进一步开发其成为更高活性的先导分子。

[0010] 2) 三氯苯达唑结构简单、易合成、毒性低、抗菌谱较广，具有进一步开发为新型农用杀菌剂的潜力。

### 具体实施方式

[0011] 为了更好地理解本发明，通过以下具体实施例对本发明的上述内容做进一步的详细说明。但不应将此理解为对本发明的限制。下列实施例中所述实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。

[0012] 实施例1：三氯苯达唑的结构式如下：



[0014] 实施例2：三氯苯达唑抗农业病原细菌活性测定

[0015] 本实验中所用的菌株为实验室-80 $^{\circ}$ C含30%甘油冻存的菌株。将冻存菌株取出，分别在农业细菌的NB固体培养基(牛肉膏:3g, 蛋白胨:5g, 酵母粉:1g, 蔗糖:10g, 琼脂:15g, 蒸馏水:1L, pH7.0; 121 $^{\circ}$ C灭菌20min)上面进行划线，在28 $^{\circ}$ C下恒温培养直到长出单菌落。分别挑取固体培养基上单菌落至农业细菌NB液体培养基(牛肉膏:3g, 蛋白胨:5g, 酵母粉:1g, 蔗糖:10g, 蒸馏水:1L; 121 $^{\circ}$ C灭菌20min)在28 $^{\circ}$ C、180rpm恒温摇床振荡培养到对数生长期。将处于对数生长期的菌株用相应的液体培养基稀释至约 $10^6$ CFU/mL备用。将化合物分别用DMSO溶解，加入液体培养基中，混合均匀，配制成浓度为200 $\mu$ g/mL的含药液体培养基。取50 $\mu$ L含药培养基和相同体积的含约 $10^6$ CFU/mL细菌培养物加入到96孔板的孔中，最终给药浓度为100 $\mu$ g/mL。含等量DMSO的相同浓度100 $\mu$ L菌液做对照。将96孔板在28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养24-48h直至对照组菌液长出，在酶标仪上测定孔中菌液的OD值(OD<sub>600</sub>)。并且另外测定100 $\mu$ L液体培养基和浓度为100 $\mu$ g/mL药剂的OD值，对培养基和药剂本身造成的OD值进行矫正。校正OD值和抑制率的计算公式如下：

[0016] 校正OD值=含菌培养基OD值-无菌培养物OD值；

[0017] 抑制率=(校正后对照培养基菌液OD值-校正后含药培养基OD值)/校正后对照培养基菌液OD值 $\times$ 100%

[0018] 将三氯苯达唑的含药液体培养基在96孔板中通过二倍稀释法稀释得到系列浓度的50 $\mu$ L含药培养基，然后根据上述相同的试验方法测定系列浓度对应的抑制率。

[0019] 所有实验设置三个重复，测定得到化合物的抑制率见表1。

[0020] 表1. 三氯苯达唑抗农业病原细菌的活性

	化合物	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	抑制率/%		
			水稻白叶枯病病原菌	柑橘溃疡病病原菌	马铃薯黑胫病病原菌
[0021]	三氯苯达唑	100	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	20.86 $\pm$ 0.27
		50	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	-
		25	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	-
		12.5	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	-
		6.25	96.19 $\pm$ 0.20	95.65 $\pm$ 1.45	-
		3.12	77.62 $\pm$ 2.51	16.49 $\pm$ 1.26	-

[0022] 注：“-”表示该浓度下抗菌活性未测定

[0023] 将抑制率大于90%的最低浓度定义为MIC，测定得到的活性数据见表2。

[0024] 表2. 三氯苯达唑抗农业病原细菌的MIC值

	化合物	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )		
		水稻白叶枯病病原菌	柑橘溃疡病病原菌	马铃薯黑胫病病原菌
[0025]	三氯苯达唑	6.25	6.25	>100
	噻菌铜	100	200	200

[0026] 注：“-”表示化合物的抗菌活性未测定

[0027] 由表1、2生测结果可知，本发明涉及的三氯苯达唑对测定菌株均表现出优异的抑制作用，在100 $\mu\text{g/mL}$ 对水稻白叶枯病病原菌、柑橘溃疡病病原菌活性强于商业化用药噻菌铜。其中对水稻白叶枯病病原菌和柑橘溃疡病病原菌作用最强，MIC值最小可达6.25 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0028] 实施例3：三氯苯达唑抗农业病原真菌活性测定

[0029] 本实验中所用的农业病原菌为实验室4 $^{\circ}\text{C}$ 保存的菌种，采用的培养基为马铃薯琼脂葡萄糖培养基（简称PDA）。PDA培养基配方：马铃薯（去皮）200g，葡萄糖20g，琼脂15g，蒸馏水1000mL，自然PH。

[0030] PDA培养基配置方法：将马铃薯洗净去皮，称200g切成小块，蒸馏水煮20min左右（土豆块软而不烂），用八层纱布过滤，用蒸馏水将滤液补足至1000mL，加入15g琼脂，20g葡萄糖，搅拌使其充分溶解后，分装于三角瓶中，121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌20分钟，冷却后备用。室内活性测定采用菌丝生长速率法。

[0031] 菌种活化：将农业病原菌在PDA平板上25 $^{\circ}\text{C}$ 培养3~6天。

[0032] 制备药板：将PDA培养基加热熔化，冷却至45-50 $^{\circ}\text{C}$ ，分别加入不同浓度混配物制成带药平板。

[0033] 接种培养：在超净台中，用打孔器在培养3~6天的菌丝边缘（生长状况尽量一致）打取菌饼（直径5mm），再用接种针挑至药板中央，然后在培养箱（25 $^{\circ}\text{C}$ ）中倒置培养。

[0034] 结果测定：空白对照组菌丝长满后，采用十字交叉法测得给药组菌丝的生长直径，计算抑制率。

[0035] 抑制率(%) = (对照菌丝直径 - 处理菌丝直径) / (对照菌丝直径 - 菌饼直径)  $\times$  100，每个浓度设置3次平行实验，测定得到化合物的抑制率见表3。

[0036] 表3. 三氯苯达唑抗农业病原真菌的活性

化合物	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	抑制率/%					
		立枯丝核	油菜菌核	番茄灰霉	小麦赤霉	稻瘟病菌	辣椒疫霉
[0037] 三氯苯达唑	100	79.69 $\pm$ 0.03	74.19 $\pm$ 0.4	92.65 $\pm$ 1.17	72.23 $\pm$ 0.53	67.35 $\pm$ 0.58	67.48 $\pm$ 1.91
	50	82.81 $\pm$ 1.97	73.93 $\pm$ 0.51	93.40 $\pm$ 0.27	64.65 $\pm$ 3.35	59.11 $\pm$ 0.54	60.40 $\pm$ 1.41
	25	79.73 $\pm$ 2.33	71.50 $\pm$ 0.17	91.85 $\pm$ 0.25	66.37 $\pm$ 1.74	47.29 $\pm$ 1.13	54.40 $\pm$ 0.47
	10	59.56 $\pm$ 0.26	61.04 $\pm$ 0.03	59.88 $\pm$ 0.25	53.13 $\pm$ 0.14	34.85 $\pm$ 1.25	40.82 $\pm$ 0.70
	5	49.31 $\pm$ 0.60	45.24 $\pm$ 0.78	37.21 $\pm$ 1.38	34.17 $\pm$ 0.67	25.60 $\pm$ 2.38	31.55 $\pm$ 0.60

[0038] 注：“-”表示该浓度下抗菌活性未测定

[0039] 利用SPSS软件求出半数效应浓度 ( $EC_{50}$ )。测定得到的活性数据见表4。

[0040] 表4. 三氯苯达唑抗农业病原真菌的 $EC_{50}$ 值

化合物	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	立枯丝核	油菜菌核	番茄灰霉	小麦赤霉	稻瘟病菌	辣椒疫霉
[0041] 三氯苯达唑	4.39	4.85	6.92	11.26	28.90	21.15
啞菌酯	49.29	82.47	>100	27.43	>100	-

[0042] 注：“-”表示化合物的抗菌活性未测定

[0043] 由表3、4生测结果可知,本发明涉及的三氯苯达唑对测定菌株均表现出优异的抑制作用,对农业病原真菌半数效应浓度 ( $EC_{50}$ ) 均强于商业化用药啞菌酯。其中三氯苯达唑对立枯丝核的抑制活性最好, $EC_{50}$ 值是4.39 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0044] 综上所述,本发明所述的三氯苯达唑对农业病原细菌、真菌,展现出广谱性、高活性的特点,具有进一步研究和开发的價值。