

ABSTRAKT

Isoflavonsynthasa (IFS; CYP93C) hraje klíčovou roli v biosyntéze rostlinných sekundárních metabolitů – isoflavonoidů. Tyto fenolické látky, známé díky širokému spektru svých biologických účinků, jsou produkovány především rostlinami z čeledi bobovitých (Fabaceae). Ačkoliv bylo nejméně 225 isoflavonoidů popsáno i v 59 dalších čeledích, ortolog známých *IFS* z bobovitých rostlin byl doposud popsán pouze v jediné nebobovité rostlině – *Beta vulgaris* (čeleď Chenopodiaceae).

Tato diplomová práce si na základě zmíněných poznatků kladla za cíl (1) identifikovat ortologní geny pro isoflavonsynthasu ve vybraných bobovitých a nebobovitých rostlinách a (2) vytvořit systém pro ověřování správné funkce těchto genů.

Naše metodika pro identifikaci ortologů *IFS* se osvědčila v případě dvou zkoumaných bobovitých rostlin – *Phaseolus vulgaris* L. a *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng, v jejichž genomické DNA byly nově identifikovány kompletní sekvence genu pro IFS. Aby bylo možno v budoucnu ověřit správnou funkci těchto a dalších případných genů pro IFS, byla provedena pilotní studie s IFS izolované z *Pisum sativum* L. (CYP93C18; GenBank number AF532999). Gen pro CYP93C18 byl identifikován, klonován s využitím Gateway™ technologie a vnesen do *Arabidopsis thaliana* – rostliny postrádající biosyntetickou dráhu isoflavonoidů. Správná funkce *CYP93C18* v transgenních rostlinách pak byla ověřována na čtyřech úrovních: PCR s primery specifickými k *IFS* (DNA), RT-PCR (RNA), Western bloty (proteiny) a HPLC-MS (metabolity). Zároveň byla potvrzena správná buněčná lokalizace CYP93C18 metodou transientní exprese fúzních proteinů IFS::GFP v listech *Nicotiana benthamiana*. Fluorescenční signál byl konfokálním mikroskopem pozorován na endoplasmatickém retikulu, což odpovídá predikované přítomnosti signálního peptidu na N-konci IFS, stejně jako modelu generovanému *in silico* na základě homologie cytochromů P450.