

УДК 581.557:579.841.3:612.6.052.4

**ФОРМУВАННЯ СИМБІОЗУ У ЛЮПИНУ,
ІНОКУЛЬОВАНОГО Tn5-МУТАНТАМИ
BRADYRHIZOBIUM SP. (LUPINUS) У ПОЛЬОВИХ УМОВАХ**

© 2009 р. Н. М. Мельникова¹, В. М. Мельник¹, Л. М. Михалків¹,
С. В. Омельчук¹, С. Я. Коць¹, Р. А. Якимчук²

¹*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

²*Уманський державний педагогічний університет ім. Павла Тичини
(Умань, Черкаська обл., Україна)*

В умовах дрібноділянкових польових експериментів досліджували формування симбіозу у рослин люпину при інтродукції у їх ризосферу Tn5-мутантів *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*. Показано, що при вирощуванні люпину в ґрунтовій культурі характер бульбочкоутворення та азотфіксуюча активність симбіозу відрізнялися від раніше встановлених у вегетаційних дослідях. Виявлено, що інокуляція насіння люпину транспозоновим мутантом 168/5 сприяла формуванню корневих бульбочок та збільшенню надземної маси рослин у фазі бутонізації порівняно з батьківським штамом *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168.

Ключові слова: *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*, *Lupinus luteus L.*, Tn5-мутанти, бобово-ризобіальний симбіоз

Бобово-ризобіальний симбіоз – потужне джерело збагачення ґрунтів корисними для рослин сполуками азоту, що є екологічно безпечним та економічно доцільним (Кретович, 1987). Це зумовлює актуальність детального вивчення процесів формування і функціонування симбіотичних азотфіксуючих систем, зокрема у люпину, який широко культивується у світі. Використання транспозонових мутагенезу (Simon et al., 1983) дозволяє одержувати штами ризобій, за допомогою яких можна вивчати механізми різних процесів життєдіяльності цих мікроорганізмів, зокрема тих, що відбуваються при встановленні симбіотичних взаємовідносин із бобовими рослинами (Онищук и др., 2001; Noel et al., 2000; Wei Xueming, Bauer, 1999). Результати окремих напрямів досліджень процесів формування бобово-ризобіального симбіозу можуть бути використані для розвитку низки прикладних аспектів, зокрема при створенні потужних азотфіксуючих систем.

Разом із дослідженням геному та визначенням симбіотичних властивостей Tn5-мутантів ризобій необхідним також є вивчення інших особливостей цих мікроорганізмів, зокрема, їх впливу на ефективність формування симбіотичних азотфіксуючих систем за дії різних абіотичних та біотичних факторів. Було показано, що присутність окремих ґрунтових бактерій у ризосфері бобових рослин може чинити значний модулюючий вплив на формування симбіозу з гомологічними штамми ризобій (Мельникова и др., 2002). Значну роль у розвитку симбіотичних взаємовідносин бобових рослин і бульбочкових бактерій відіграє також кількісний і якісний вміст різних сполук у ґрунті, зокрема азоту (Streeter, 1985) та інші фактори (Коць та ін., 2002; Rainbird et al., 1983). Дослідження систем, які включають не поодинокі біотичні й абіотичні фактори, а їх комплекс, може бути одним із важливих етапів у вирішенні питання впливу навколишнього середовища на розвиток бобово-ризобіального симбіозу, зокрема, при інтродукції у ризосферу рослин Tn5-мутантів бульбочкових бактерій.

Адреса для кореспонденції: Мельник Вікторія Миколаївна, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна;
e-mail: vasyliukv@mail.ru

Метою нашої роботи було вивчення особливостей формування бобово-ризобіального симбіозу люпину, інокульованого Tn5-мутантами *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*, в умовах ґрунтової культури за дії комплексу природних ґрунтово-кліматичних факторів.

МЕТОДИКА

У дослідженнях використовували бульбочкові бактерії *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* штамів 168 і 10, їх Tn5-мутанти 168/5 і 10/1, а також люпин жовтий (*Lupinus luteus* L.) сорту Круглик.

Мікроорганізми вирощували на манітно-дріжджовому агаризованому середовищі протягом 8-10 діб при 28°C. Суспензію для інокуляції насіння готували шляхом змиву бактеріальної біомаси з поверхні середовища стерильною водопровідною водою. Титр мікроорганізмів у вихідній суспензії складав 10^8 , тоді як розрахована кількість бактеріальних клітин на насінину – 10^6 .

Ефективність формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу рослинами люпину при інокуляції насіння транспозоновими мутантами досліджували на базі Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (Київська обл., сірий супіщаний ґрунт) та агробіостанції Уманського державного педагогічного університету ім. П. Тичини (Черкаська обл., темно-сірий, опідзолений ґрунт) протягом 2005–2007 років. У таблицях подані дані одного експерименту. Проте, аналогічні закономірності спостерігалися також і в інших проведених дослідках.

Насіння стерилізували 16%-ним перексидом водню протягом 15 хв, промивали впродовж години водопровідною водою, інокульовали протягом години бактеріальною суспензією і висівали в ґрунт. Рослинний матеріал для аналізу відбирали у фазах бутонізації і цвітіння рослин. Визначали кількість і масу бульбочок, їх азотфіксуючу активність (Hardy et al., 1968), а також надземну масу рослин. Контролями були варіанти, де насіння інокульовали батьківськими штамми ризобій люпину *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168 і 10. Площа облікової ділянки складала 2 м². Досліди проводили в чотириразовій повторності. Експериментальні дані статистично обробляли за загальноприйнятими методами (Доспехов, 1985). У таблицях подані середні арифметичні та їх стандартні відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Tn5-мутанти 168/5 і 10/1 бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168 і 10, що використовували для інокуляції рослин люпину, були одержані нами за допомогою транспозонового мутагенезу (Василюк та ін., 2007). Раніше у модельних вегетаційних експериментах було встановлено, що мутант 10/1 штаму *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 10 відзначається високою вірулентністю, проте бульбочки, сформовані за інокуляції насіння люпину цими бактеріями, мають низьку азотфіксуючу активність упродовж досліджуваного періоду вегетації рослин. Водночас транспозоновий мутант 168/5 штаму *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168 характеризувався досить низькою азотфіксуючою активністю і був середньовірулентним (Василюк та ін., 2007).

Результати дрібноділянкових польових досліджень показали, що у фазі бутонізації люпину в разі інокуляції насіння транспозоновим мутантом 168/5 збільшувалася кількість і маса кореневих бульбочок, а також маса надземної частини рослин порівняно з варіантом, де люпин інфікували бактеріями *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168 (табл. 1, 2). У той же час мутант 10/1 при інтродукції його в ризосферу рослин із насінням не виявляв суттєвого позитивного впливу на процес бульбочкоутворення. Кількість бульбочок, утворених при інокуляції насіння цими бактеріями, була близькою до аналогічного показника у відповідному контрольному варіанті (табл. 1). Крім того, симбіоз, сформований при інтродукції у ризосферу люпину Tn5-мутанту 10/1, не стимулював наростання надземної маси рослини-хазяїна (табл. 2). Необхідно відзначити, що за рівнем азотфіксуючої активності в цей період симбіотичні системи, утворені за умови внесення в ґрунт мутантних ризобій *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 10/1 і 168/5, достовірно не відрізнялися від систем, сформованих у варіантах, де насіння інокульовали батьківськими штамми (табл. 1). У фазі цвітіння рослини, інокульовані транспозоновими мутантами, за кількістю та масою бульбочок були схожими на контрольні (табл. 1). Водночас азотфіксуюча активність бобово-ризобіального симбіозу у разі інфікування рослин люпину бактеріальною суспензією Tn5-мутанта 168/5 була нижчою порівняно з варіантом з використанням батьківського штаму (табл. 1). Під час цвітіння рослини люпину дослідних варіантів за масою надземної частини

Таблиця 1

Бульбочкоутворення та азотфіксуюча активність симбіозу у люпину за інокуляції рослин Тп5-мутантами *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*

Штами та Тп5- мутанти <i>Bradyrhizobium sp. (Lupinus)</i>	Кількість бульбочок, шт. ^а	Маса бульбочок, г/рослину ^а	Азотфіксуюча активність, мкмоль С ₂ Н ₄ / (г бульбочок • год) ^б
бутонізація			
10	20,2±1,3	0,42±0,03	18,10±2,39
10/1	19,5±1,1	0,42±0,02	14,47±1,91
168	18,2±1,3	0,37±0,03	13,96±1,43
168/5	21,5±1,0*	0,48±0,03*	16,11±1,89
цвітіння			
10	22,2±1,8	0,65±0,05	6,90±0,98
10/1	23,2±1,3	0,61±0,06	7,46±1,04
168	24,0±2,1	0,69±0,06	5,34±0,71
168/5	25,2±1,5	0,65±0,08	3,23±0,35*

Примітки до таблиць 1 і 2:

а – середні арифметичні та їх стандартні відхилення обраховували з 55-65 рослин, відібраних рандомізовано по 12-18 з кожної ділянки;

б – визначення азотфіксуючої активності проводили у 20-разовій повторності (відбирали по 5 рослин з кожної ділянки);

* – достовірно відмінні значення порівняно з варіантом, де використовували для інокуляції насіння люпину відповідний батьківський штам бульбочкових бактерій при $P \leq 0,05$.

Таблиця 2

Надземна маса (г/рослину)^а люпину, інокульованого Тп5-мутантами *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*

Штами та Тп5-мутанти <i>Bradyrhizobium sp. (Lupinus)</i>	Фаза розвитку рослин	
	бутонізація	цвітіння
10	10,64±0,74	23,55±1,92
10/1	11,02±0,62	26,75±1,86
168	9,06±0,59	24,33±2,13
168/5	11,44±0,68*	26,20±1,97

суттєво не відрізнялися від рослини у відповідних контрольних варіантах (табл. 2).

Потрапляючи в ґрунт з інокульованим насінням, бульбочкові бактерії зазнають впливу низки факторів навколишнього середовища, наприклад, продуктів метаболізму ризосферних мікроорганізмів (Мельникова и др., 2002; Суховицкая и др., 1997) і речовин, які виділяються назовні насінням при проростанні та коренями рослин (Fountain et al., 1977; Gade et al., 1981). Як наслідок, симбіотичні (наприклад, конкурентноздатність, вірулентність) (Суховицкая и др., 1997) або інші властивості (наприклад, ростова активність) (Косенко, Мандровская, 1998) ризобій можуть змінюватися, впливаючи на

ефективність формування симбіозу. Очевидно, створені нами симбіотичні системи або безпосередньо бульбочкові бактерії зазнавали впливу біологічно активних речовин кореневої зони рослин. Про це свідчить зміна рівнів бульбочкоутворення і азотфіксації симбіотичних асоціацій, сформованих рослинами люпину при внесенні у ґрунт з інокульованим насінням Тп5-мутантів ризобій 10/1 і 168/5 порівняно з показниками, отриманими у вегетаційних експериментах (Василюк та ін., 2007). Так, якщо в умовах модельного вегетаційного дослідження транспозонний мутант 10/1 відзначався високою вірулентністю на рослинах люпину і низькою азотвідновлювальною здатністю порівняно зі штамом *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 10 (Василюк

ФОРМУВАННЯ СИМБІОЗУ У ЛЮПИНУ

та ін., 2007), то в умовах ґрунтової культури показники кількості бульбочок і питомої азотфіксуючої активності достовірно не відрізнялися в цих варіантах (табл. 1). Зміна активності бульбочкоутворення на коренях люпину та азотфіксуючої активності симбіотичних систем, сформованих при інтродукції мутанта 10/1, що були встановлені в умовах ґрунтової культури, порівняно з аналогічними показниками у вегетаційних експериментах може бути пов'язана з нижчою конкурентоздатністю мутантних ризобій щодо бульбочкових бактерій – представників аборигенної мікрофлори. Крім того, спроможність Tn5-мутантних мікросимбіонтів конкурувати з ґрунтовими популяціями бульбочкових бактерій може змінюватися під впливом останніх. Так, на моделі симбіотичної системи конюшина – *Rhizobium trifolii* було показано, що Tn5-мутанти, які при моноінокуляції формували азотфіксуючий симбіоз, у разі одночасної інокуляції з батьківським штамом втрачали цю властивість, ймовірно, через низький рівень конкурентоздатності мутантних мікроорганізмів (Sargent et al., 1987). Якщо конкурентна здатність досліджуваних нами транспозонових мутантів послаблена, то можна припустити, що частина бульбочок на коренях люпину могла бути сформована ризобіями, що знаходились у ґрунті до внесення *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 10/1 і 168/5 із інокульованим насінням. Відома досить широка розповсюдженість бульбочкових бактерій люпину в ґрунтах (Мильто, 1982). Відмінності у формуванні симбіозу в ґрунтових умовах і у вегетаційних експериментах також спостерігалися при інокуляції насіння люпину транспозоновим мутантом 168/5. Вплив інтродукованих бульбочкових бактерій на формування симбіотичних азотфіксуючих систем певною мірою може бути зумовлений рістрегулюючою активністю ризобій щодо представників аборигенної мікрофлори, які, в свою чергу, можуть сприяти розвитку потужних азотфіксуючих систем. Таке припущення підтверджується літературними даними, де йдеться про те, що інокуляція люцерни генетично-модифікованими бактеріями *Sinorhizobium meliloti* викликала посилення ростових процесів у популяціях ґрунтових мікроорганізмів (Da, Deng, 2003). Серед факторів, які можуть суттєво впливати на ефективність формування бобово-ризобіального симбіозу, разом із зміною властивостей симбіотичних азотфіксуючих мікроорганізмів, може бути також здатність останніх зумовлювати бульбочкоутворюючу активність рослин (Sargent et al., 1987).

Відомо, що активність відновлення атмосферного азоту бобово-ризобіальними системами тісно пов'язана з фотосинтетичною активністю рослин (Слесаревичус и др., 2001). Зі збільшенням активності нітрогеназного комплексу інтенсивність фотосинтетичних процесів зростала (Сытников и др., 2006). У наших експериментах було показано, що у фазі бутонізації рослин при азотфіксуючій активності бульбочок у варіанті з використанням Tn5-мутанта 168/5, яка не перевищувала аналогічний показник у варіанті з батьківським штамом *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168 (табл. 1), маса надземної частини люпину зростала (табл. 2). Очевидно, прискорення накопичення надземної маси рослин пов'язане з тим, що значна кількість бульбочок, утворених на коренях люпину при інтродукції в ризосферу мутантних ризобій 168/5 формує загальний високий рівень азотфіксуючої активності симбіозу, який сприяє збільшенню кількості відновленого азоту, що використовується рослинами. Абіотичні умови навколишнього середовища також можуть впливати на формування потужного азотфіксуючого апарату та характер прояву симбіотичних властивостей гомологічними бульбочковими бактеріями (Коць та ін., 2002; Rainbird et al., 1983).

Таким чином, бобово-ризобіальний симбіоз, сформований рослинами люпином в умовах ґрунтової культури за інокуляції Tn5-мутантами бактеріями 168/5 штаму *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168, був ефективнішим порівняно з симбіотичними системами, створеними при інфікуванні рослин Tn5-мутантом 10/1. Найбільш виражений позитивний вплив при формуванні симбіозу спостерігався у фазі бутонізації рослин при інтродукції в ризосферу люпину транспозонового мутанта 168/5. Інокуляція насіння цими бактеріями сприяла посиленню бульбочкоутворення і збільшенню надземної маси макросимбіонта. При вирощуванні люпину в польових умовах характер бульбочкоутворення та азотфіксуюча активність симбіозу відрізнялися від попередньо встановлених у вегетаційних дослідках. Проведені нами дослідження показали необхідність подальшого вивчення властивостей Tn5-мутантів *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*, зокрема, їх конкурентоздатності та рістстимулюючої активності щодо різних популяцій ґрунтових мікроорганізмів.

ЛІТЕРАТУРА

- Василюк В.М., Мельникова Н.М., Михалків Л.М. та ін. Формування симбіотичних взаємовідносин рослин люпину з транспозоновими мутантами *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 3. – С. 233-241.
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1985. – 371 с.
- Косенко Л.В., Мандровская Н.М. Влияние лектина гороха на рост микросимбионтов гороха и биосинтез ими экзогликанов // Микробиология. – 1998. – Т. 67. – С. 626-630.
- Коць С.Я., Михалків Л.М., Мандровська Н.М. та ін. Вплив глюкану *Sinorhizobium meliloti* на утворення та функціонування азотфіксуючих симбіотичних систем люцерни за різного водозабезпечення // Физиология и биохимия культ. растений. – 2002. – Т. 34, № 5. – С. 413-418.
- Кретович В.Л. Усвоение и метаболизм азота у растений. – М.: Наука, 1987. – 485 с.
- Мельникова Н.Н., Булаченко Л.В., Курдиш И.К. и др. Формирование и функционирование бобово-ризобияльного симбиоза у растений сои при интродукции штаммов родов *Azotobacter* и *Vacillus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, №4. – С. 427-432.
- Мильто Н.И. Клубеньковые бактерии и продуктивность бобовых растений. – Минск: Наука и техника, 1982. – 295 с.
- Онищук О.П., Курчак О.Н., Шарытова Л.А. и др. Анализ различных типов конкурентоспособности у Tn5-мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 11. – С. 1507-1512.
- Слесаревичус А.К., Пранайтис П.И., Духовский П.В., Станайтене Я.И. Эффективность инокуляции и интенсивность фотосинтеза растений сои, инокулированных различными видами и штаммами клубеньковых бактерий // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т. 33, № 4 – С. 298-302.
- Суховицкая Л.А., Мохорт Т.Г., Клышко Г.М. Выживаемость *Rhizobium* в бинарных популяциях с фосфатмобилизующими бактериями и некоторые критерии подбора ризобияльно-фосфатмобилизующих композитов // Весці АН Беларусі. Сер. біял. – 1997. – № 3. – С. 12-16.
- Сытников Д.М., Коць С.Я., Маличенко С.М., Куризий Д.А. Интенсивность фотосинтеза и лектиновая активность листьев сои при инокуляции ризобиями совместно с гомологичным лектином // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 2. – С. 189-195.
- Da H.N., Deng S.P. Survival and persistence of genetically modified *Sinorhizobium meliloti* in soil // Appl. Soil Ecol. – 2003. – V. 22, № 1. – P. 1-14.
- Fountain D. W., Foard D.E., Replogle W.D., Yang W.K. Lectin release by soybean seeds // Science. – 1977. – V. 197. – P. 1185-1187.
- Gade W., Jack M.A., Dahl J.B. et al. The isolation and characterization of a root lectin from soybean (*Glycine max* (L.), cultivar Chippewa) // J. Biol. Chem. – 1981. – V. 256, № 24. – P. 12905-12910.
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene – ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. – 1968. – V. 43. – P. 1185-1207.
- Noel K.D.R., Forsberge L.E., Carlson R.W. Varying the abundance of O-antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris* // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182, № 19. – P. 5317-5324.
- Rainbird R.M., Atkins C.A., Pate J.S. Effect of temperature on nitrogenase functioning in cowpea nodules // Plant Physiol. – 1983. – V. 73, № 2. – P. 392-395.
- Sargent L., Huang S.Z., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. Split-root assays using *Trifolium subterraneum* show that *Rhizobium* infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive *Rhizobium* strain // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53, № 7. – P. 1611-1619.
- Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering transposon mutagenesis in gram-negative bacteria // Biotechnology. – 1983. – № 1. – P. 784-791.
- Streeter J.G. Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity // Plant Physiol. – 1985. – V. 77, № 2. – P. 321-328.
- Wei Xueming, Bauer W.D. Tn5-induced and spontaneous switching of *Sinorhizobium meliloti* to faster-swarming behavior // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65, № 3. – P. 1228-1235.

Надійшла до редакції
12.12.2008 р.

ФОРМУВАННЯ СИМБІОЗУ У ЛЮПИНУ

FORMATION OF SYMBIOSIS IN LUPINE INOCULATED BY Tn5 MUTANTS OF *BRADYRHIZOBIUM SP. (LUPINUS)* IN FIELD

N. M. Melnykova¹, V. M. Melnyk¹, L. M. Mykhalkiv¹,
S. V. Omelchuk¹, S. Ya. Kots¹, R. A. Yakimchuk²

¹*Institute of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Science of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

²*Pavlo Tychina Uman State Pedagogical University
(Uman, Chercasy reg., Ukraine)*

Symbiosis formation in lupine under introduction of *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* Tn5 mutants into plant rhizosphere have been studied in plot field experiments. It was shown that in soil the character of nodule formation in lupine and nitrogen fixation activity of symbiosis was differed from previous data concerning of nodule formation and nitrogen reduce process, which were obtained in greenhouse investigations. It was established that the inoculation of lupine seeds by transposon mutant 168/5 promoted both root nodules formation and aboveground mass increase in budding plants as compare to parent strain of *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168.

Key words: *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*, *Lupinus luteus L.*, Tn5-mutants, legume-rhizobial symbiosis

ФОРМИРОВАНИЕ СИМБИОЗА У ЛЮПИНА, ИНОКУЛИРОВАННОГО Tn5-МУТАНТАМИ *BRADYRHIZOBIUM SP. (LUPINUS)* В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Н. М. Мельникова¹, В. Н. Мельник¹, Л. М. Михалкив¹,
С. В. Омельчук¹, С. Я. Коць¹, Р. А. Якимчук²

¹*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

²*Уманский государственный педагогический университет им. Павла Тычины
(Умань, Черкасская обл., Украина)*

В условиях мелкоделяночных полевых экспериментов исследовали формирование симбиоза у растений люпина при интродукции в их ризосферу Tn5-мутантов *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*. Показано, что при выращивании люпина в почвенной культуре характер клубенькообразования и азотфиксирующая активность симбиоза отличались от ранее установленных в вегетационных опытах. Выявлено, что инокуляция семян люпина транспозоновым мутантом 168/5 способствовала формированию корневых клубеньков и повышению надземной массы растений в фазе бутонизации по сравнению с родительским штаммом *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)*, *Lupinus luteus L.*, Tn5-мутанты, бобово-ризобийный симбиоз