

Figura V.8: Plantas de *Arabidopsis* tratadas con 100 μM (A) y 300 μM (B) de ethephon respectivamente. Fotografías tomadas 48 horas después del tratamiento. Plantas que expresan constitutivamente *HAHB4* (35S); plantas salvajes (S); plantas que expresan *HAHB4* bajo el control de su propio promotor inducible (PEL).

*V.2.3 – Las plantas transgénicas que expresan *HAHB4* son insensibles a los efectos del etileno.*

La generación de la triple respuesta es uno de los fenómenos causados por el etileno utilizado ampliamente para dilucidar los mecanismos involucrados en la síntesis y señalización de esta hormona. Se caracteriza por la generación de diferencias morfológicas que aparecen en plántulas germinadas en presencia de esta hormona con respecto a las no tratadas.

Con el objetivo de examinar si *HAHB4* interviene en otros procesos mediados por etileno se llevó a cabo un ensayo de triple respuesta con plantas transgénicas y salvajes. Las plantas fueron tratadas con 300 μM ethephon o 5 μM ACC e incubadas en oscuridad durante 3 días. Como se observa en la figura V.9 las plantas transgénicas, que expresan en forma constitutiva el gen *HAHB4*, son completamente insensibles a los efectos del etileno mientras que las que lo expresan en forma inducible presentan una insensibilidad parcial a esta hormona. En ninguna de las plántulas transgénicas estudiadas, tanto germinadas en aire o etileno, se observaron diferencias significativas en el largo del hipocotilo, en la forma del gancho apical ni en el desarrollo de raíces.



Figura V.9: Triple respuesta al etileno en plántulas etioladas de tres días. **a, c y e:** plántulas salvajes, genotipo *35S:HAHB4* y genotipo *PEL:HAHB4* sin tratar con etileno; **b, d y f:** plántula salvaje, *35S:HAHB4* y *PEL:HAHB4* crecidas en 5 μM de ACC; **g, h e i:** ganchos apicales de plántulas salvajes, *PEL:HAHB4* y *35S:HAHB4* crecidas en 5 μM de ACC; **j:** plántulas de 3 días crecidas en fotoperíodo normal (salvaje – *35S:HAHB4*).

A pesar de que se puede apreciar que el largo del hipocotilo de las plántulas transgénicas es menor que el de las salvajes, esta diferencia no sería consecuencia del efecto del etileno en la triple respuesta sino una característica fenotípica intrínseca. Al comparar plantas transgénicas no tratadas con las incubadas con etileno no se detectaron cambios en el largo del hipocotilo (Tabla V.3). La diferencia que se observó en el tamaño del hipocotilo entre los genotipos salvaje y transgénico es consecuencia del retraso en el desarrollo que presentan las transgénicas de alta expresión y no producto de la acción del etileno.

Genotipo	Control (mm) \pm SD	ACC (mm) \pm SD	Control/ACC
Salvajes	9,4 \pm 0,43	2,5 \pm 0,27	27,2 %
<i>35S:HAHB4</i>	4,5 \pm 0,55	4,2 \pm 0,46	93,4 %
<i>PEL:HAHB4</i>	8,6 \pm 0,48	6,2 \pm 0,79	72,4 %

Tabla V.3: Largo de los hipocotilos de plántulas etioladas salvajes o transgénicas crecidas en condiciones control o tratadas con 5 μM de ACC. Las mediciones fueron realizadas a 40 plántulas de cada genotipo y la desviación estándar (indicada en cada celda) calculada a partir del análisis estadístico. La tercera columna indica el tamaño

proporcional de la plántula tratada con ACC con respecto a su control respectivo sin tratar.

Los resultados obtenidos en estos ensayos corroboran la hipótesis planteada a partir de los datos moleculares: *HAHB4* inhibe la percepción de etileno. La evidencia más fuerte que sostiene esta hipótesis es que aún tratadas con etileno o ACC exógenos, las plantas transgénicas que expresan *HAHB4* no presentan las alteraciones típicas de estos tratamientos. La inhibición en la biosíntesis de la hormona no puede explicar *per se* estos efectos indicando que la percepción tiene que estar reprimida.

V.2.4 – El etileno activa la expresión de HAHB4.

La expresión de muchos de los componentes de las vías de síntesis y percepción de etileno está regulada por la acumulación de esta hormona. De esta manera, cuando los niveles de etileno son elevados se dispara un mecanismo de retroalimentación negativa que inhibe su síntesis (Wang y col., 2002; Zhong y Burns, 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos determinar si el etileno regulaba la expresión de *HAHB4* y si a su vez el factor de transcripción regula negativamente la síntesis de la hormona. Con este objetivo se midieron los niveles de transcripto correspondientes a *HAHB4* en plantas de girasol tratadas con etileno con respecto a los niveles en plantas sin tratar crecidas en idénticas condiciones. La figura V.10A muestra que la expresión de *HAHB4* en plantas de girasol se induce significativamente por el agregado exógeno de etileno, alcanzando un nivel máximo una hora después de hecho el tratamiento. Para saber si esta regulación se da a nivel transcripcional se midieron los niveles de expresión del gen reportero *GUS* en plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción *PEL:GUS* tratadas con etileno con respecto a los niveles en plantas del mismo genotipo pero sin tratar. La variación de la actividad del promotor de *HAHB4* a causa del etileno muestra una excelente correlación con los resultados obtenidos de las mediciones en girasol mostrando el mismo pico de actividad una hora después del tratamiento (figura V.10A barras blancas).

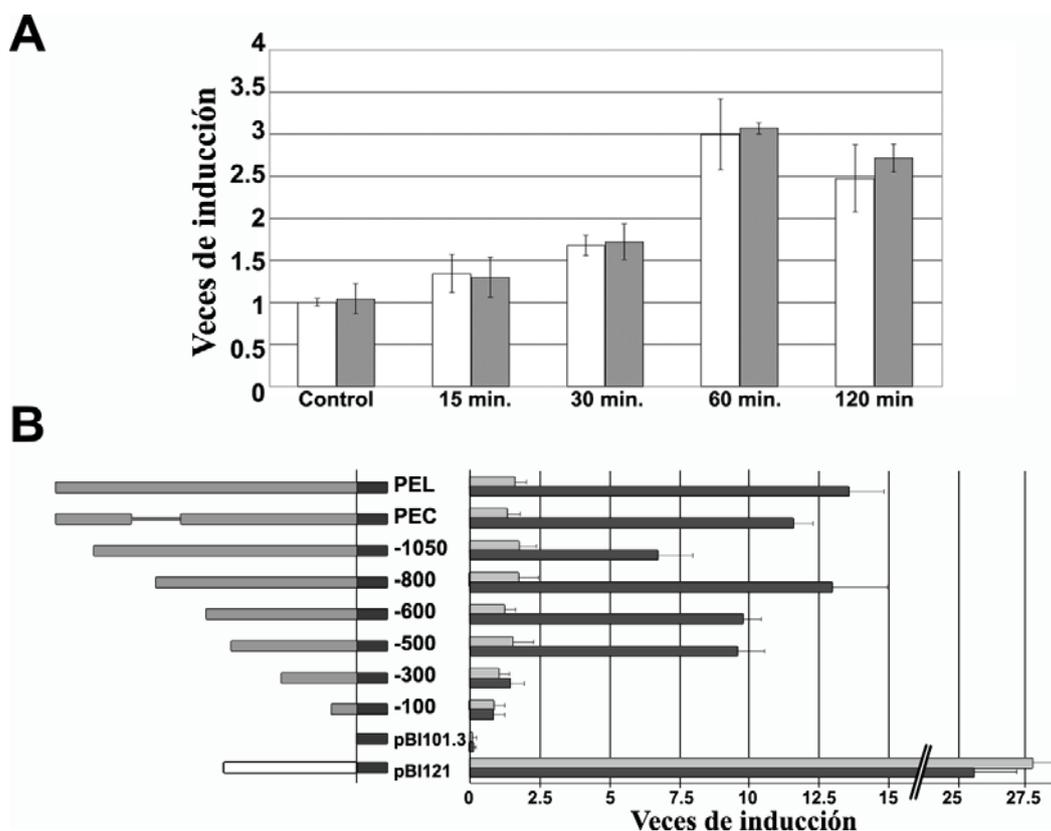


Figura V.10: La regulación de *HAHB4* por etileno ocurre a nivel transcripcional. **A:** las barras grises muestran los niveles de transcripts correspondientes a *HAHB4* en girasol en función del tiempo después del tratamiento con etileno, medidos por RT-PCR cuantitativa; las barras blancas muestran los niveles de *GUS* controlados por el promotor de *HAHB4* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* tratadas con etileno en función del tiempo. Los tratamientos se realizaron con 500 μ M de ethephon o 30 μ M ACC. **B:** niveles de expresión del gen *GUS* in plantas transformadas con diferentes segmentos del promotor de *HAHB4* fusionados a este gen reportero. A la izquierda se esquematizan las construcciones usadas para transformar las plantas. En el medio se encuentra el nombre dado a cada construcción. A la derecha, las barras grises y negras indican los niveles de expresión medidos en presencia o ausencia de ACC respectivamente. Como controles positivo y negativo se utilizaron respectivamente plantas transformadas con una construcción donde la expresión del gen *GUS* es dirigida por el promotor 35S (pBI121) o sin promotor (pBI101.3).

Con el objeto de identificar cuáles serían los elementos en *cis* responsables de la regulación del promotor de *HAHB4* por la presencia de etileno, se utilizaron plantas de *Arabidopsis* transformadas con distintos segmentos del mismo fusionados al gen *GUS*. Como se puede observar en la figura V.10B la inducción del promotor de *HAHB4* es fácilmente detectable en todas las construcciones que incluyen al menos las primeras 500 pb pero indetectable con segmentos menores. Estos resultados nos permitieron localizar transitoriamente a las cajas responsables de la respuesta a etileno entre los

nucleótidos -300 y -500 corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. El análisis bioinformático de esta región no detectó ningún elemento conocido de respuesta a etileno en esta región, lo que estaría indicando la posible existencia de un elemento de respuesta no descrito aún. En este sentido se realizaron varias mutaciones en este segmento pero no hubo ninguna respuesta convincente en las plantas transformadas con las mismas. El análisis bioinformático del promotor completo sí detectó la presencia de un elemento conocido como W-Box entre las posiciones -1109 y -1103. Este elemento es reconocido por factores de transcripción de la familia WRKY que al unirse a esta secuencia activan numerosos genes de respuesta a etileno y a estrés (Yu y col., 2001; Miao y col., 2004). Podría pensarse que esta caja no es funcional en este promotor, ya que varias construcciones que no la incluyen responden normalmente al tratamiento con la hormona. Sin embargo, el análisis de una construcción quimérica que incluye sólo un promotor mínimo (-100) y la región comprendida entre las bases -1009 y -1131 ($\Delta 1:1$) mostró respuesta a etileno aún cuando ésta claramente no contenía la región comprendida entre -300 y -500 (figura V.II). Debido a que en esta región se localiza el elemento W-box, decidimos confirmar la participación de esta caja en la respuesta a etileno, para lo cual mutamos el elemento y evaluamos la capacidad de respuesta de la construcción mutada. La nueva construcción, llamada $\Delta 1:1$ mut w, fue utilizada para transformar plantas y compararla con el mismo fragmento sin mutar. El resultado del experimento fue una inhibición total de la capacidad del promotor de responder al tratamiento con la hormona, lo que permite concluir que este elemento, al igual que los que se encuentran en la región -300 y -500 son funcionales. Debido a que sólo la eliminación de las dos regiones mencionadas produce una pérdida de la respuesta a etileno, podemos concluir que ambas cajas actúan independientemente y que sus funciones son redundantes, al menos en lo que respecta a la regulación por etileno.

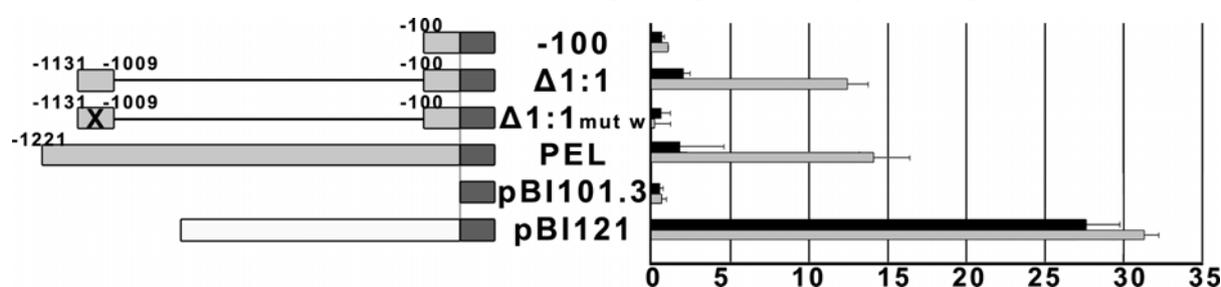


Figura V.II: El elemento W-Box ubicado en la posición -1109 y -1103 participa de la regulación de *HAHB4* por etileno. A la izquierda se esquematizan las construcciones utilizadas para transformar las plantas de *Arabidopsis*. En el medio se encuentra el nombre dado a cada construcción. A la derecha las barras negras y grises indican los

niveles de expresión de *GUS* medidos por RT-PCR cuantitativa en plantas sin tratar y tratadas con ACC respectivamente. Como controles positivo y negativo se utilizaron respectivamente plantas transformadas con una construcción donde la expresión del gen *GUS* es dirigida por el promotor *35S* (pBI121) o carentes de promotor (pBI101.3).

Habiendo determinado que la expresión de *HAHB4* se induce por la acción de etileno y que este aumento afecta algunos de los procesos mediados por esta hormona nos planteamos investigar cómo variaba la expresión de este gen en las plantas de girasol durante los procesos en los cuales interviene el etileno. Se tomaron hojas de plantas de girasol que presentaban distintos grados de senescencia y se cuantificaron por RT-PCR los niveles del transcripto de *HAHB4*. Los replicados biológicos en este ensayo se hicieron con hojas de una misma planta. El análisis reveló que los niveles de expresión de *HAHB4* aumentan a medida que las hojas van avanzando en la etapa de senescencia (Figura V.12). El aumento en los niveles de *HAHB4* parece ser una consecuencia directa del aumento de la concentración de etileno durante la senescencia y a su vez el factor de transcripción regularía los efectos de la hormona durante el proceso de envejecimiento.

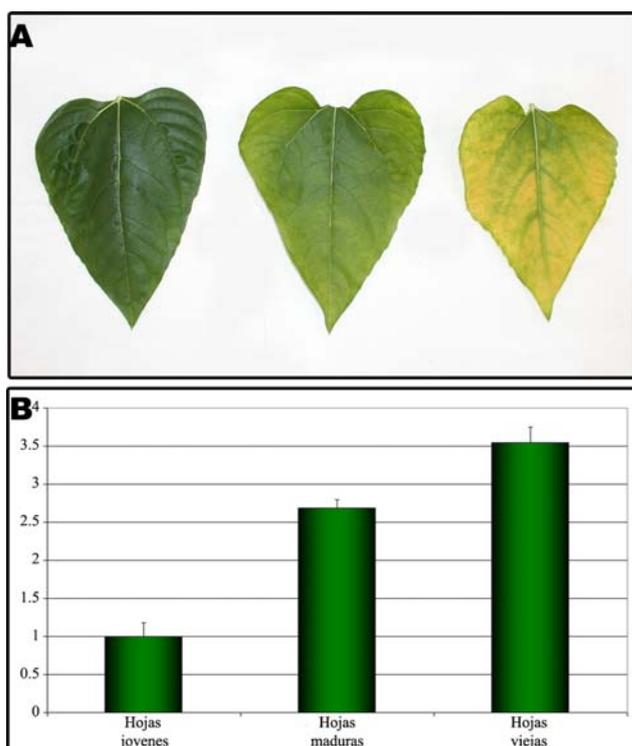


Figura V.12: Niveles de expresión de *HAHB4* en hojas con distinto grado de senescencia. **A:** hojas usadas para cada ensayo. **B:** niveles relativos de *HAHB4* en las hojas correspondientes al panel A medidos por RT-PCR cuantitativa y expresados en forma relativa a los niveles medidos en una hoja joven tomados arbitrariamente como uno.

V.2.5 – La expresión de los genes de girasol homólogos a los identificados como blancos en Arabidopsis se co-regula junto con HAHB4.

Con el objeto de determinar cuáles son los mecanismos moleculares mediados por *HAHB4* en girasol decidimos cuantificar en estas plantas los niveles

transcripcionales de genes homólogos a los detectados como blancos en el microarreglo. A pesar de que la información disponible sobre el genoma de girasol es bastante limitada, pudimos encontrar secuencias homólogas a varias de los genes blancos identificados en *Arabidopsis*. Algunas de estas secuencias corresponden a genes bien identificados mientras que otras fueron ESTs (del inglés “*expressed sequence tags*”) que presentaban alta homología con los genes de interés. Usando esta información se diseñaron oligonucleótidos específicos (sección III.15) y se cuantificaron los niveles de expresión de los distintos transcritos en plantas de girasol crecidas en condiciones controladas, sometidas a estrés hídrico, o tratadas con etileno.

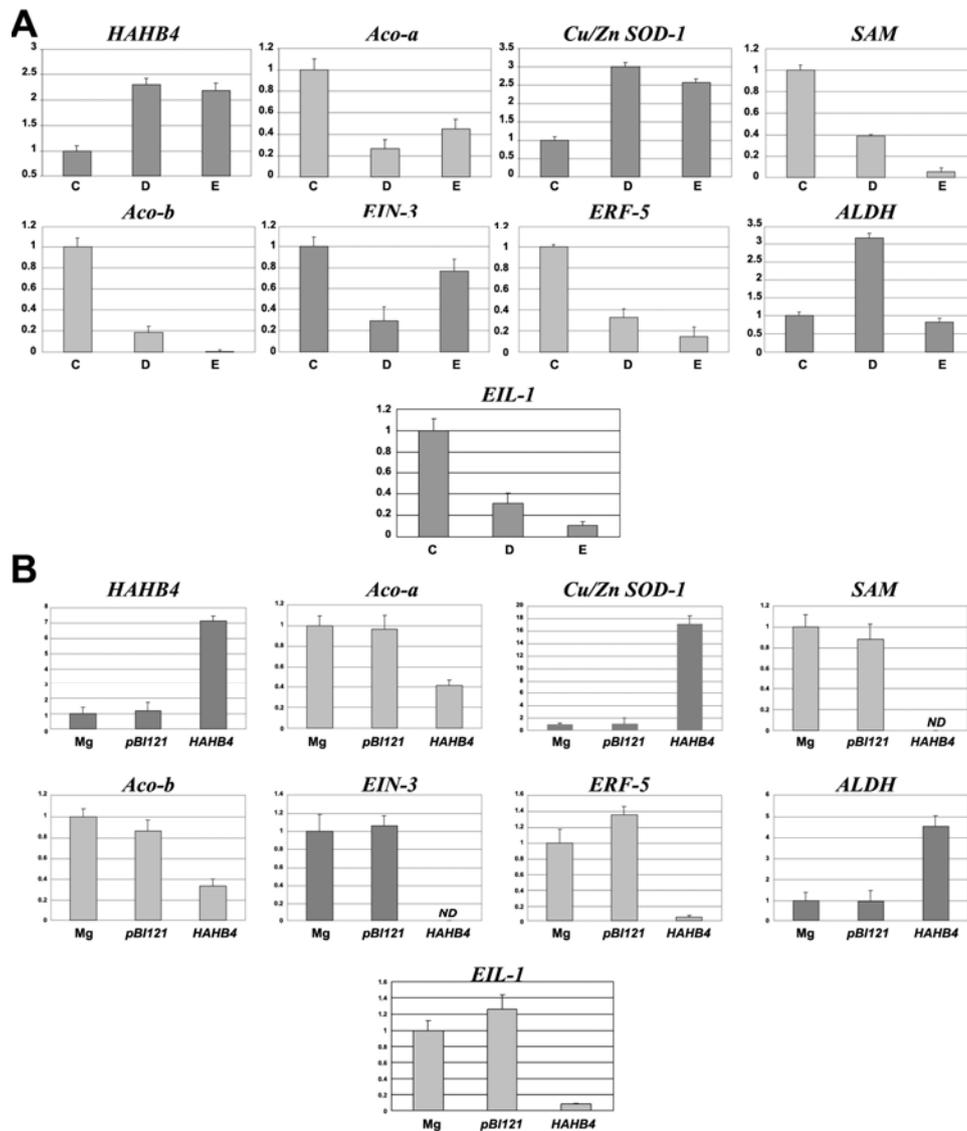


Figura V.13: Los genes involucrados en la síntesis y percepción de etileno en girasol están regulados por *HAHB4*. **A:** niveles de transcritos de *HAHB4*, Acc-oxidasas (ACOa y b), Cu/Zn superóxido-dismutasa 1 (Cu/Zn SOD1), etileno-insensible 3 (EIN3), Factor de respuesta a etileno 5 (ERF5), S-adenosilmetionina-sintetasa (SAM), botaina-

aldehído deshidrogenasa (ALDH), proteína 1 similar a etileno-insensible 3 (EIL1) crecidas en condiciones controladas (C), sometidas a estrés hídrico (D) o tratadas con etileno (E). **B:** niveles de expresión de los mismos genes en hojas de girasol transformadas transitoriamente con *35S:HAHB4* (*HAHB4*), con *35S:GUS* (pBI121) o con solución de MgCl₂ (Mg). Todos los ensayos fueron repetidos al menos 3 veces con duplicados internos. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor p fue inferior a 0,01.

Como se puede observar en la Figura V.13A todos los genes cuantificados cambian sus niveles de expresión conjuntamente con *HAHB4*. Las dos condiciones ensayadas, estrés hídrico y el tratamiento con etileno, generan la inducción de la expresión de este factor de transcripción (Figura V.13A primer panel) y este incremento en la síntesis de *HAHB4* conlleva un aumento/represión en la transcripción de los genes analizados como posibles blancos. Como controles de este ensayo se utilizaron genes que en principio no tienen relación con el etileno pero que son regulados por *HAHB4* (*Cu/Zn*, *SOD1* y *ALDH*). Los genes ligados a efectos del etileno, *ACOa*, *ACOb*, *EIN3*, *ERF5*, *SAM* y *EIL1*, se reprimieron en las condiciones ensayadas. A pesar de la concordancia de todos estos resultados, no podemos perder de vista la posibilidad de que esta represión, observada en condiciones de estrés, sea la consecuencia directa del tratamiento recibido y no de la expresión de *HAHB4*.

Para descartar esta posibilidad se transformaron en forma transitoria hojas de girasol con la construcción *35S:HAHB4* y de esta forma se obtuvieron plantas que sobreexpresan el gen sin necesidad de un estímulo externo. En estas hojas transformadas en forma transitoria determinamos los niveles de los transcriptos correspondientes a los probables genes blancos sin necesidad de un tratamiento externo. Para eliminar cualquier efecto producido por el mismo proceso de transformación se usaron, como control, hojas transformadas con MgCl₂ (solución de transformación) o con un vector que expresa el gen *GUS* controlado por el promotor *35S* (pBI121). Los resultados se muestran en la figura V.13B e indican claramente que la sobreexpresión de *HAHB4* en hojas de girasol produce una reducción dramática en la expresión de los genes homólogos a los identificados en Arabidopsis, involucrados en las vías de síntesis y percepción de etileno. El conjunto de las observaciones indica que el mecanismo molecular de acción de *HAHB4* observado en Arabidopsis, está conservado en girasol.

V.3 – Discusión

La sequía es el factor ambiental que más afecta la producción agrícola de todo el mundo trayendo aparejada un enorme impacto económico negativo en las regiones afectadas. Los modelos climáticos usados en la actualidad indican que los períodos de sequía serán cada vez más frecuentes como una consecuencia a largo plazo del calentamiento global (Salinger y col., 2005; Cook y col., 2007). Estos estudios hechos por climatólogos alertan sobre la necesidad imperiosa de desarrollar estrategias que permitan la adaptación de los cultivos a estos cambios desfavorables.

Las plantas usan una combinación de diferentes estrategias para resistir condiciones de sequía (Levitt 1980). En las regiones áridas las plantas anuales combinan un ciclo de vida corto con una aceleración en su desarrollo que coincide con la temporada de lluvias y de esta forma evitan los efectos de la deshidratación. Otros mecanismos desarrollados por los vegetales durante la evolución incluyen el cierre de estomas, el desarrollo aumentado de las raíces y la disminución del follaje, todos con el objetivo de optimizar el consumo y la utilización del agua (Fischer y Turner, 1978). La fitohormona ABA participa de muchos de estos mecanismos de respuesta. Los niveles de ABA se incrementan cuando la planta siente la escasez de agua. El ABA activa la transcripción de genes del tipo DREB (del inglés “*Drought responsive elements*”) que participan activamente en muchos de los mecanismos de respuesta mencionados (Chini y col., 2004; Kasukabe y col., 2004; Umezawa y col., 2004). También es capaz de producir el cierre estomático *per se* generando un cambio en la polarización de las membranas plasmáticas de las células de la guarda (Taiz y Zeiger, 2006).

Los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Dezar y col., 2005a) y en este trabajo de Tesis indican claramente que la tolerancia a sequía que confiere el gen *HAHB4* no ocurre por una de las vías clásicas y conocidas. Tanto los genes del tipo *DREB* así como sus genes blancos conocidos no varían sus niveles de expresión cuando *HAHB4* se expresa constitutivamente. Tampoco se observó un cambio significativo en el cierre estomático ni en la tasa de transpiración de las plantas transgénicas.

Como ya hemos mencionado, los procesos de aceleración de la senescencia y abscisión de las hojas se asocian con la adaptación de las plantas a la sequía como una estrategia de éstas para disminuir el follaje y el concomitante consumo de agua. En las plantas perennes este comportamiento permite completar el ciclo de vida y la formación de semillas a expensas de la supervivencia del individuo. Es por eso que aún los

períodos de sequía cortos o leves son suficientes para disminuir la productividad generando un impacto económico negativo. Es por eso que algunos autores han puesto en práctica estrategias que evitan la entrada en el estadio de senescencia con el objetivo de generar plantas tolerantes a sequía (Lin y col., 2007; Rivero y col., 2007).

El análisis del transcriptoma de las plantas transgénicas que expresan en forma constitutiva *HAHB4* nos permitió dilucidar los mecanismos por los cuales este factor de transcripción genera tolerancia al estrés hídrico. Los resultados obtenidos indican que un grupo de genes cuyos productos proteicos participan en la síntesis y percepción de etileno están reprimidos en las plantas de expresión constitutiva. Notoriamente, este mismo grupo de genes aumenta sus niveles de expresión cuando las plantas se enfrentan a condiciones de sequía. Como estos genes codifican proteínas que participan de la síntesis y de la percepción de etileno, es claro que el efecto de este aumento es una aceleración en la entrada en el estadio de senescencia, la formación de algunas semillas y la afección notoria de la producción general y sobrevivencia de la planta. En este sentido la represión de la transcripción de estos genes en las plantas transgénicas que expresan *HAHB4* ya sea en condiciones normales de crecimiento como cuando sufre estrés hídrico explica la tolerancia a sequía observada. Es claro que si la sequía se prolonga y es muy fuerte, la expresión constitutiva de este gen va a impedir que la planta genere algunas semillas y así produzca descendencia. Pero en los casos en los que la escasez de agua no sea tan marcada o prolongada, situaciones bastante más habituales en los campos de nuestro país, este gen va a evitar que la planta entre en senescencia y muera y va a posibilitar que una vez pasado el período de sequía la planta pueda continuar normalmente con su ciclo de vida.

Nuestros resultados indicaron que la represión de la síntesis de etileno mediada por *HAHB4* podría estar dada en dos pasos importantes: reprimiendo la transcripción de la enzima SAM-sintetasa e inhibiendo la síntesis de la ACC-oxidasa. Además también se detectó un incremento de la transcripción de la enzima 2-ODD. Esta última, homóloga a la enzima E8 de tomate, se induce durante la maduración del fruto y actúa inhibiendo la conversión de ACC a etileno mediada por la ACC-oxidasa (Penarrubia y col., 1992).

La inhibición en la biosíntesis de etileno explica muchas de las características fenotípicas observadas en las plantas transgénicas como el marcado retraso en la entrada en senescencia (figura V.7). Sin embargo, la disminución en la producción de etileno no es suficiente para explicar el hecho de que las plantas transgénicas no

respondan al agregado de etileno exógeno como sucedió cuando fueron tratadas con ethephon (productor de etileno) o ACC (último intermediario en la producción de etileno). Esto último sólo se explica como una clara insensibilidad a la acción de esta hormona (figura V.8 y V.9) lo que lleva a la conclusión de que también las vías de percepción y transducción de señales disparadas por el etileno están realmente afectadas.

La participación de los factores de transcripción *EIN3* y *EIL1* es fundamental en la transducción de la señal disparada tras la unión del etileno a su receptor ya que estas dos proteínas son el punto de confluencia de toda la vía. Las plantas mutantes con pérdida total de función en alguna de estas dos proteínas presentan una respuesta casi normal a la acción de la hormona según lo informado por Chao y col., (1997). Esto se debe a que ambos factores pueden compensar recíprocamente, al menos en parte, la falta del otro; pero la mutación de ambos genes a la vez provoca una insensibilidad casi total a la acción de la hormona. Teniendo en cuenta que la expresión *EIN3* y *EIL1* están reprimidos en las plantas transgénicas que expresan *HAHB4*, era de esperar, como sucedió, observar una insensibilidad total a la acción de esta hormona, aún si ésta es agregada exógenamente.

En este capítulo de la Tesis se han presentado evidencias experimentales que indican que la expresión de *HAHB4* aumenta por la acción del etileno alcanzando sus niveles máximos una hora después de producirse el estímulo. Asimismo se detectó un aumento en la expresión de este gen en hojas de girasol que presentaban signos claros de senescencia. Al menos dos elementos en *cis* presentes en el promotor de este gen serían responsables de esta regulación positiva. La realización de mutaciones seguidas de transgénesis y análisis de la expresión del gen reportero *GUS* nos permitieron identificar estos dos elementos. Uno, llamado W-box, está ubicado entre los nucleótidos -1109 a -1103 y según lo informado por otros autores es reconocido por proteínas de la familia WRKY, en especial por miembros que son fuertemente inducidos por etileno. No pudimos localizar con exactitud la posición de la segunda caja pero sí su ubicación aproximada, entre -500 y -300, así como su acción redundante con la del elemento W-box, ya que sólo la remoción conjunta de ambos segmentos genera insensibilidad a la hormona. El conjunto de resultados nos indica la existencia de un mecanismo de regulación del tipo retroalimentación negativa entre el factor de transcripción y el etileno. Este tipo de mecanismo donde el aumento del etileno produce una reducción en su propia síntesis ya había sido descrito y explicado a través

de la represión de la ACC-oxidasa (Guzman y Ecker, 1990). El caso de *HAHB4* encaja perfectamente en este cuadro. El aumento de los niveles de etileno, por ejemplo durante los períodos de sequía, produciría un incremento en la expresión del gen que va a actuar reprimiendo la transcripción de la SAM-sintetasa y de la ACC-oxidasa y por ende, los niveles de la hormona. De esta forma la planta es capaz de mantener la homeostasis interna.

La manipulación genética es difícil en algunas especies vegetales y por ende, obliga a utilizar sistemas heterólogos con el fin de obtener información acerca de procesos moleculares o fisiológicos, así como la funcionalidad de un determinado gen. Si bien estos sistemas son de gran utilidad para cumplir esos objetivos, su uso exige extremo cuidado en la interpretación de los datos y la validación de los mismos en el sistema biológico de origen. Según nuestros resultados, la expresión de los genes relacionados a la síntesis y percepción de etileno en girasol está reprimida en discos de plantas transformados en forma transitoria con la construcción capaz de sobrerexpresar *HAHB4* mostrando de esta forma una muy buena correlación con los datos obtenidos en *Arabidopsis*. Sin embargo y según la información disponible hasta la fecha, ninguno de los posibles ortólogos de *Arabidopsis* ha sido descrito como mediador de los procesos regulados por etileno. Esto podría ser explicado por el hecho de que ninguno de los HD-Zip I de *Arabidopsis* puede ser considerado con certeza el gen ortólogo de *HAHB4*. Los análisis bioinformáticos sobre las secuencias y los funcionales realizados con estos factores de transcripción en *Arabidopsis* llevan a pensar que quizás *HAHB4* sea un gen estructural y funcionalmente exclusivo de girasol.

Finalmente podemos concluir que la función de *HAHB4* en girasol está estrechamente ligada a la presencia y actividad del etileno. En este sentido cuando la hormona alcanza niveles elevados se produce una activación de la transcripción de *HAHB4* el cual a su vez va a reprimir la síntesis y bloquear los efectos de esta fitohormona manteniendo la homeostasis de la planta. En las plantas transgénicas, la represión de la senescencia, normalmente disparada por el etileno, explica en parte la tolerancia a sequía. El retraso causado por esta represión va a permitir que la planta se mantenga fotosintéticamente activa por un período mayor de tiempo así como la síntesis de osmoprotectores, generando como consecuencia un retraso en la muerte de la planta. Estos resultados presentan a *HAHB4* como un nuevo intermediario en la interrelación entre la fitohormona etileno y el efecto de la sequía.