



Revue semestrielle – Université Ferhat Abbas Sétif 1

REVUE AGRICULTURE



Applications et limites des marqueurs moléculaires pour l'identification des variétés d'olivier

Applications and limits of molecular markers for the identification of olive tree varieties

Rayda BEN AYED^{1,*}

¹ Université de Sfax-Tunisie.

*Auteur : Dr. Rayda BEN AYED, BP "23bis", Sakiet Ezzit, Sfax, 3021, TUNISIE.

E-mail : raydabenayed@yahoo.fr; Tel: +21652892296.

ARTICLE INFO

Reçu : 15-05-2017

Accepté : 29-09-2017

Keywords:

Olea europaea L.,
genetic diversity,
authenticity,
polymorphism, nuclear
DNA, cytoplasmic DNA

Mots Clés:

Olea europaea L.,
diversité génétique,
authenticité,
polymorphisme, ADN
nucléaire, ADN
cytoplasmique.

ABSTRACT

The olive tree (*Olea europaea* L.) is a fruit tree belonging to the *Oleaceae* family. It is cultivated throughout the Mediterranean basin and is used for the olive oil production. Olive tree counts a multitude of varieties and can be alive for very long time. Numerous studies have been carried out in various countries to characterize and identify genetic resources of the olive tree. Several methods have been proposed to identify and distinguish varieties. The first one used was based on morphological characteristics related to the different components of the tree (flowers, leaves, fruits,...). However, this method has proved insufficient due to their low discriminatory power and their instability owing to interaction with environmental factors. Recently, new complementary approaches have been proposed using molecular markers founded on genetic polymorphism. The multidisciplinary approach based on the polymorphism of nuclear DNA and proved by statistical and computational systems made molecular markers reliable tools and could be used successfully in the olive tree to distinguish between varieties, to authenticate olive oil and to avoid frauds.

RESUME

L'olivier (*Olea europaea* L.) est un arbre fruitier appartenant à la famille des Oléacées. Il est cultivé dans tout le bassin méditerranéen et sert à la fabrication de l'huile d'olive. L'olivier compte une multitude de variétés et peut vivre très longtemps. De nombreux travaux de caractérisation et d'identification des ressources génétiques de l'olivier ont été réalisés dans différents pays. Plusieurs descripteurs ont été proposés pour identifier et distinguer les variétés. Les premiers descripteurs utilisés étaient les caractères morphologiques liés aux différentes composantes de l'arbre (fleurs, feuilles, fruits,...). Cependant, ces descripteurs se sont révélés insuffisants du fait de leur faible pouvoir de discrimination et leur instabilité liée à l'interaction avec les facteurs environnementaux. Récemment, de nouvelles approches complémentaires ont été proposées à l'aide de marqueurs moléculaires neutres basés sur le polymorphisme génétique. L'approche multidisciplinaire fondée sur des marqueurs moléculaires basés sur le polymorphisme de l'ADN nucléaire et appuyés par des outils statistiques et informatiques a fait des marqueurs moléculaires des outils fiables. Ces marqueurs pourraient être utilisés chez l'olivier pour distinguer entre les variétés, authentifier l'huile d'olive et éviter les fraudes.

1. Introduction

L'olivier (*Olea europaea* L.) est une espèce ligneuse spécifique de la région méditerranéenne. Il est cultivé depuis la plus haute antiquité (Ben Ayed *et al.*, 2016). Comme de nombreux arbres, l'olivier est une espèce

allogame avec une floraison abondante et la dispersion de son pollen se fait essentiellement par le vent (anémophile). De nos jours, la culture de l'olivier occupe une place primordiale dans de nombreux pays méditerranéens aussi bien du point de vue de son apport économique considérable que pour sa valeur sociale en tant que facteur générateur d'emplois. Le patrimoine oléicole est représenté par plus de 2000 variétés (Bartoloni *et al.*, 1998), avec plus de 3000 cas de synonymie décrits dans 54 pays. Toutefois, les démarches de qualité qui sont entreprises par la filière oléicole impliquent l'identification des cultivars et la traçabilité des produits. Des approches efficaces et fiables sont donc recherchées pour sécuriser ces démarches dans le but de la gestion, la caractérisation, l'identification variétale et l'évaluation des ressources d'oliviers. Le nombre élevé de variétés cultivées d'olivier conduit à des problèmes de confusion aussi bien dans la gestion des variétés, mais aussi dans la traçabilité et l'authenticité des huiles d'olive produites. A cet égard, il est indispensable d'attribuer un génotype de référence pour chaque variété.

L'objectif de cette étude est de passer en revue les différentes méthodes utilisées pour l'identification variétale de l'olivier d'une part, et d'autre part, d'illustrer l'importance des marqueurs moléculaires et cytoplasmiques pour l'étude de l'authenticité de l'huile produite.

2. Discrimination des variétés d'olivier par une description morphologique

Les variétés d'olivier sont habituellement identifiées et classées par une description morphologique en utilisant les différents organes de l'olivier (feuille, fruit, fleur,...). De ce fait, divers travaux d'identification variétale ont été élaborés dans plusieurs pays méditerranéens à partir de la combinaison des caractères morphologiques, agronomiques et phénologiques (Trigui and Msallem, 2002). Ces marqueurs possèdent de nombreux inconvénients. En effet, ils sont longs à observer, lourds à réaliser et peuvent être influencés par des facteurs externes de l'environnement. Néanmoins, si la plupart des variétés sont aisément reconnues grâce à des caractères morphologiques discriminants, l'identification de certains n'est pas fiable. En effet, le nombre limité des caractères morphologiques discriminants n'est parfois pas adéquat avec la richesse variétale du patrimoine tunisien. Par conséquent, plusieurs cas d'homonymie (plusieurs génotypes sous la même dénomination) et de synonymie (plusieurs dénominations pour le même génotype) sont rencontrés et posent le problème d'identification du génotype de référence pour certaines variétés (Figure).

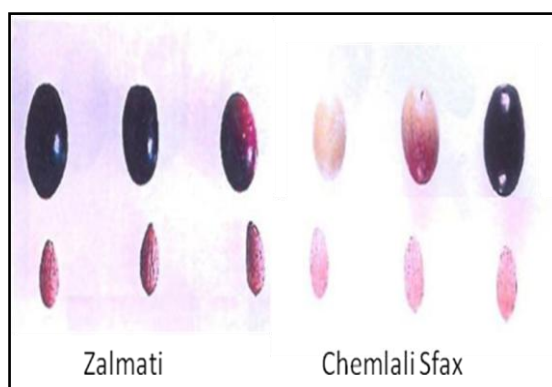


Figure : caractères morphologiques de deux variétés synonymes d'olivier

3. Etude de l'authenticité de l'olivier par marqueurs moléculaires basés sur le polymorphisme de l'ADN nucléaire

L'utilisation des marqueurs moléculaires basés sur le polymorphisme de l'ADN nucléaire est une approche indépendante des conditions environnementales. Ils ont été appliqués avec succès pour surmonter ce problème de traçabilité et ils viennent compléter l'apport de la description morphologique et des caractéristiques biochimiques et organoleptiques pour la caractérisation et la traçabilité des variétés d'huiles d'olive (Cserhádi *et al.*, 2005). Ces techniques reposent sur l'utilisation des marqueurs moléculaires en utilisant surtout la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction). En effet, les marqueurs moléculaires tels que les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SCARs (Sequence-Characterized Amplified Regions), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), SSR (Simple Sequence Repeat) et plus récemment les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont très utilisés pour étudier la variabilité du genre *Olea*.

2.1. Marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Le marqueur RAPD est un marqueur non spécifique de locus. Il permet de révéler simultanément une dizaine à une centaine de *loci* correspondant à des bandes d'amplification qui peuvent être présentes ou absentes chez un individu. Le profil obtenu par une amorce RAPD se présente sous forme d'empreinte génétique.

Les marqueurs RAPD ont été les premiers à être mis en œuvre et utilisés pour l'estimation de la diversité génétique, la discrimination entre les cultivars d'olivier, pour l'étude de la diversité inter ou intra-variétale, pour mettre en place les relations génétiques entre cultivars et pour étudier la différence génétique du genre *Olea* (Belaj *et al.*, 2003 ; Martins-Lopes *et al.*, 2007). Selon Bronzini *et al.* (2002), l'utilisation de la technique RAPD offre un outil valable pour distinguer les cultivars d'olivier et comprendre l'histoire de la domestication de cette espèce. Les marqueurs RAPD sont aussi utilisés pour essayer d'étudier l'authenticité et la traçabilité de l'huile d'olive (Pasqualone *et al.*, 2001). Cependant, de nombreux auteurs ont conclu la non-reproductibilité des marqueurs RAPD dans l'authentification de l'huile d'olive, qui a abouti à un schéma électrophorétique incompatible. Cette technique RAPD comporte aussi plusieurs limites, outre le manque de reproductibilité puisqu'elle est très sensible à la concentration de l'ADN et aux conditions d'amplification. Le caractère dominant et le problème de reproductibilité des résultats caractérisant les marqueurs RAPD ont fait que ceux-ci ont été abandonnés au profit des marqueurs SSR ou AFLP.

2.2. Marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Le marqueur AFLP est un marqueur non spécifique de locus. Elle consiste en une amplification par PCR de l'ADN génomique après digestion par deux enzymes de restriction et ligature d'un adaptateur d'environ 20 paires de bases.

La technique AFLP a été employée pour étudier la structure génétique des populations d'olivier regroupant à la fois des génotypes de type cultivés et sauvages ; elle a permis aussi de confirmer l'hypothèse que *Olea europaea* subsp. *laperrini* et *Olea europaea* subsp. *marocanna* constituent une forme intermédiaire entre l'olivier sauvage et celui qu'on cultive actuellement (Angiolillo *et al.*, 1999). Selon les travaux effectués par Baldoni *et al.* (2006), les marqueurs AFLP ont permis de différencier les populations sauvages et celles cultivées dans les régions continentales et dans les régions insulaires du bassin central de la méditerranée. La technique AFLP a également été employée pour étudier la diversité génétique et l'identification des cultivars chez l'olivier. Elle a ainsi été utilisée par Angiolillo *et al.* (1999) pour obtenir un grand nombre de marqueurs. Cela a été utilisé dans le traitement des relations génétiques entre les variétés cultivées et sauvages, c'est à dire entre les *Olea europaea* L. et les autres espèces appartenant au genre *Olea*. Cette technique a été également utilisée pour étudier la diversité génétique d'une gamme de cultivars espagnols et italiens d'olive (Sensi *et al.*, 2003). Cette technique a été utilisée pour évaluer la structure de la diversité génétique entre les variétés d'olives cultivées communes en Méditerranée. Différentes études ont rapporté qu'il est possible d'utiliser des marqueurs AFLP pour le génotypage des espèces d'oliviers.

En ce qui concerne la traçabilité de l'huile d'olive, des études récentes ont confirmé que les profils AFLP de l'ADN purifié à partir de feuilles et de l'huile monovariétale du même cultivar étaient comparables. Ces auteurs ont évalué la possibilité d'identifier l'huile d'olive vierge de dix cultivars différents par l'analyse des marqueurs AFLP en utilisant six combinaisons d'amorces AFLP (Pafundo *et al.*, 2005).

Pour l'AFLP, la qualité de l'ADN isolé à partir d'huile d'olive semble être le problème (très faible quantité, une forte dégradation et la richesse en polysaccharides et en composés phénoliques). La mauvaise qualité de l'ADN est responsable des résultats incohérents et de faible fiabilité des profils AFLP qui est due à l'inhibition des enzymes de restriction et de l'activité ADN polymérase au cours de la PCR. Ce qui rend ces marqueurs insuffisants pour discriminer les variétés d'olivier.

2.3. Marqueurs SSR (Simple Sequence Repeats)

Les microsatellites ou séquences simples répétées (SSR) sont des éléments d'ADN répétés en tandem formés de mono, di, tri et tétranucléotides. Les microsatellites les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n et (GATA)_n, les valeurs de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Les microsatellites sont des marqueurs codominants, multi-alléliques, transférables et très polymorphes (Ben Ayed *et al.*, 2012).

Chez l'olivier, les marqueurs microsatellites ont été largement utilisés pour diverses études. En effet, les SSRs ont montré un grand pouvoir de discrimination entre les variétés (Ben Ayed *et al.*, 2015). Ces marqueurs sont considérés comme plus polymorphes que les marqueurs RAPD et AFLP et ils peuvent ainsi distinguer des variétés génétiquement très proches d'une part (Ben Ayed *et al.*, 2016) et de tracer l'authenticité des huiles pour la protection et la détection des fraudes d'autre part (Ben Ayed *et al.*, 2012).

En 2000, Rallo *et al.* ont criblé une banque génomique d'olivier par hybridation en utilisant comme sondes des motifs microsatellites. Les clones positifs ont été séquencés afin de désigner des amorces pour l'amplification

PCR. Il a ainsi été possible d'étudier le polymorphisme de 46 variétés et d'identifier 26 allèles SSR pour 5 *loci* différents. Carriero *et al.* (2002) ont également identifié dix marqueurs SSR dans le génome de l'olivier en utilisant la même méthode. Ils ont étudié la diversité génétique de 16 variétés d'*Olea europaea*. Ces marqueurs sont très utilisés pour construire des cartes de liaison dans le génome d'*Olea* (De la Rosa *et al.*, 2003) et aussi pour retracer l'histoire et l'évolution de l'olivier (Belaj *et al.*, 2007).

Ces marqueurs microsatellites ont été utilisés avec succès chez l'olivier pour plusieurs objectifs à savoir (1) la caractérisation des ressources génétiques de l'olivier (Belaj *et al.*, 2003), (2) l'étude de la diversité intravariétale (De la Rosa *et al.*, 2003), (3) la vérification de la paternité et de la compatibilité (Ben Ayed *et al.*, 2012), (4) la résolution des problèmes d'homonymies et de fausse appellation (misnamings) chez l'olivier (Carriero *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2003; Ben Ayed *et al.*, 2015) et (5) la traçabilité de l'authenticité des huiles pour la protection et de la détection des fraudes (Ben Ayed *et al.*, 2012).

2. 4. Marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Les marqueurs SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) sont basés sur des changements ponctuels d'une base dans une séquence donnée. Ces marqueurs sont généralement bi-alléliques et permettent d'appréhender des variations de gènes impliqués dans le contrôle de caractères d'intérêt.

La détection des SNPs nécessite tout d'abord une amplification PCR sur différents génotypes, puis la révélation d'un SNP est effectuée par séquençage direct, extension d'amorces, RFLP etc... Toutefois la technique la plus simple et la moins coûteuse reste la PCR-RFLP. C'est-à-dire une amplification PCR de la région contenant ce SNP suivie d'une digestion enzymatique et séparation de fragments sur gel d'agarose. Cependant d'autres techniques de séquençage permettent de tester un grand nombre de SNPs à la fois et sont facilement automatisables.

Les SNPs, comme tout marqueur génétique, peuvent être exploités de différentes manières. Leur extrême précision permet des analyses très fines dans l'amélioration génétique des plantes comme la recherche de variabilité liée à des caractères intéressants et prisés par le consommateur. La puissance des SNPs est due essentiellement à leur présence sur l'ensemble du génome tant dans les introns que dans les exons (Ben Ayed *et al.*, 2014).

Pour analyser ce type de marqueur, il est nécessaire de disposer d'un niveau élevé d'information de la séquence du génome. Par conséquent, seul quelques SNPs ont été signalés chez l'olivier, puisque à l'heure actuelle, peu de données sont publiquement disponibles sur les séquences, et utilisés pour étudier la diversité génétique de l'olivier (Consolandi *et al.*, 2007; Ben Ayed *et al.*, 2014, 2015). Consolandi *et al.* (2007) ont étudié le polymorphisme génétique de plusieurs variétés d'olivier appartenant à plusieurs pays (Italie, Grèce, Portugal et Tunisie) en utilisant les marqueurs SNPs qui sont localisés dans des gènes dont les séquences sont publiées dans GeneBank du site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ils ont trouvé plusieurs SNPs dans les deux gènes *OEX* (Cycloartenol Synthase) et *OEW* (Lupeol Synthase). En outre, Santos Macedo *et al.* (2009) ont identifié 5 SNPs dans la séquence partielle du gène *OeAOX2 oxydase*. Par ailleurs, Muleo *et al.* (2009) ont établi plusieurs SNPs dans le gène *phytochrome A* en utilisant pour l'analyse d'ADN la technique HRM (High-Resolution Melting). Cependant, à l'heure actuelle, d'après nos connaissances, uniquement deux études ont utilisé les marqueurs SNPs pour l'étude de la traçabilité de l'huile d'olive (Ben Ayed *et al.*, 2014). Récemment, la méthode la plus intéressante pour l'analyse des marqueurs SNPs est la détection simultanée de plusieurs SNPs à partir d'un seul échantillon d'ADN. Ben Ayed *et al.* (2014) ont entamé une étude basée sur la génétique d'association ou «*Disequilibrium Linkage mapping*» pour tracer l'authenticité de l'huile d'olive tunisienne et ont montré l'efficacité de cette approche pour le contrôle et la détection des fraudes.

3. Etude de l'authenticité de l'olivier par la caractérisation du polymorphisme des génomes cytoplasmiques

Le polymorphisme de l'ADN chloroplastique (ADNcp) et mitochondrial (ADNmt) ont été utilisés chez l'olivier à différentes fins. En 2011, Bracci *et al.* ont démontré que le chloroplaste d'olivier contient 130 gènes et 644 séquences répétitives (parmi lesquelles 633 mono-nucléotides, 6-di, 3-tétra, 2-penta-nucléotides ont été identifiées). Les polymorphismes d'ADN chloroplastique ont été utilisés en tant que marqueurs moléculaires pour identifier les cultivars d'*Olea europaea* L. Egalement, davantage de marqueurs chloroplastiques ont été développés sur la base du génome chloroplastique afin d'étudier l'histoire évolutive et le processus de domestication chez l'olivier (Besnard *et al.*, 2011).

4. Conclusion

Certaines études menées au cours des dernières années indiquent que l'étude de la diversité et de la structure génétique de l'olivier cultivé à l'aide des descripteurs morphologiques ne seraient pas fiables en raison de leur dépendance des conditions environnementales. Ces problèmes pourraient être surmontés en utilisant des

marqueurs moléculaires basés sur des polymorphismes de d'ADN nucléaire et/ou cytoplasmique. Les travaux récents ont indiqué que le génotypage des marqueurs SSRs au moyen d'appareillage semi-automatique et appuyé par des approches statistiques et bioinformatiques sont l'outil le plus approprié pour caractériser les variétés d'olivier. Actuellement, des études basées sur des marqueurs SNPs basées sur la génétique d'association ou «*Disequilibrium Linkage mapping*» sont en cours de validation pour tracer l'authenticité de l'huile d'olive tunisienne.

Références bibliographiques

- Angiolillo, A., Mencuccini, M. & Baldoni, L. (1999) Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.*, 98, 411–421.
- Baldoni, L., Tosti, N., Ricciolini, C., Belaj, A., Arcioni, S., Pannelli, G., Germana, M.A., Mulas, M. and Porceddu, A. (2006) Genetic Structure of Wild and Cultivated Olives in the Central Mediterranean Basin. *Annals of Botany*, 98, 935-942.
- Belaj, A., Munõz-Diez, C., Baldoni, L., Porceddu, A., Barranco, D. & Satovic, Z. (2007) Genetic diversity and population structure of wild olives from the North-western Mediterranean assessed by SSR markers. *Ann. Bot.*, 100, 449–458.
- Belaj, A., Satovic, Z., Ismaeli, H., Panajoti, D., Rallo, L., Trujillo, I. (2003) RAPD genetic diversity of Albanian olive germplasm and its relationships with other Mediterranean countries. *Euphytica*, 130, 387–395.
- Ben Ayed, R., Grati-kamoun, N., Sans-grout, C., Moreau, F. & Rebai, A. (2012). Characterization and authenticity of virgin olive oil (*Olea europaea* L.) cultivars by microsatellite markers. *European Food Research and Technology*, 234(2), 263-271.
- Ben Ayed, R., Kallel, I., Ben Hassen, H. & Rebai, A. (2014) SNP marker analysis for validating the authenticity of Tunisian olive oil. *Journal of Genetics*, 93(3), 148-154.
- Ben Ayed, R., Ennouri, K., Ben Hassen, H., Triki, M.A., Rebai, A. (2015). Comparaison between DNA-based, pomological and chemical markers accomplished by bioinformatic tools to distinguish within Tunisian olive cultivars. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 7(3), 408–421.
- Ben Ayed, R., Ben Hassen, H., Ennouri, K., Rebai, A. (2016) Genetic Markers Analyses and Bioinformatic Approaches to Distinguish Between Olive Tree (*Olea europaea* L.) Cultivars. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*, DOI 10.1007/s12539-016-0155-x.
- Besnard, G., Hernandez, P., Khadari, B., Dorado, G. and Savolainen, V. (2011) Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. *BMC Plant Biology*, 11(80).
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C. & Sebastiani, L. (2011) Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis, *Plant Cell. Rep.*, DOI 10.1007/s00299-010-0991-9
- Bronzini de Caraffa, V., Giannettini, J., Gambotti, C. and Maury, J. (2002) Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica*, 123, 263-271.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., Giorio, G. (2002) Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 104, 301–307.
- Cserháti, T., Forgács, E., Deyl, Z., Miksik, I. (2005) Chromatography in authenticity and trace ability tests of vegetable oils and dairy products: A review. *J. Biomed. Chromatogr.*, 19, 183–190.
- Consolandi, C., Palmieri, L., Doveri, S., Maestri, E., Marmioli, N., Real, S., Lee, D., Baldoni, L., Tosti, N., Severgnini, M., De Bellis, G., Castiglioni, B. (2007) Olive variety identification by ligation detection in a universal array format. *J. of Biotechnology*, 129, 565-574.
- De la Rosa, R., Angiolillo, A., Rallo, L., Guerrero, C., Pellegrini, M., Besnard, G., Bervillé, A., Martin, A., Baldoni, L. (2003) A first genetic linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 106, 1273-1282.
- Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., Gomes, S., Meirinhos, J., Santos, L., Guedes-Pinto, H. (2007) RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 54, 117-128.
- Muleo, R., Chiara Colao, M., Miano, D., Cirilli, M., Intrieri, M.C., Baldoni, L., Rugini, E. (2009) Mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis in olive germplasm. *Genome*, 52(3), 252-260.
- Pafundo, S., Agrimonti, C., Marmioli, N. (2005) Traceability of Plant Contribution in olive oil by Amplified Fragment Length Polymorphisms. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6995-7002.
- Pasqualone, A., Caponio, F. & Blanco, A. (2001) Inter-simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars, *Eur. Food Res. Technol.*, 213, 240- 243.
- Rallo, P., Dorado, G., Martin, A. (2000) Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 101, 984–989.

- Santos Macedo, E., Cardoso, H.G., Herná'ndez, A., Peixe, A.A., Polidoros, A., Ferreira, A., Cordeiro, A., Arnholdt-Schmitt, B. (2009) Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Physiol. Plant*, 137, 532–552.
- Sensi, E., Vignani, R., Scali, M., Masi, E., Cresti, M. (2003) DNA fingerprinting and genetic relatedness among cultivated varieties of *Olea europaea* L. estimated by AFLP analysis. *Sci. Hortic.*, 97(3-4), 379-388.
- Trigui, A., Msallem, M. (2002) Oliviers de Tunisie: catalogue des variétés autochtones et types locaux, Vol 1. Ministère de l'Agriculture, Sfax, Tunisia.