



# Les faibles doses d'une mycotoxine (DON) du blé sans effet notable chez le porc

**L**e DON est la principale mycotoxine rencontrée sur les blés français, le plus souvent à de faibles doses dont les effets chez le porc étaient mal connus. Une étude a eu pour objectif de rechercher un éventuel effet de telles doses chez le porcelet et le porc charcutier.

*Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un programme associant ARVALIS, l'ITP, l'ADAESO et l'unité de Pharmacologie-Toxicologie de l'INRA avec la participation financière de l'ACTA.*

Les céréales françaises peuvent contenir du déoxynivalénol (DON), une mycotoxine produite au champ par des champignons du genre *Fusarium*. Le porc apparaît concerné par la contamination en DON en raison de son alimentation composée majoritairement de céréales, et d'une sensibilité plus forte que celles des volailles (ROTTER et al, 1996). La toxicité du DON chez le porc a fait l'objet de plusieurs investigations montrant principalement une altération de la consommation alimentaire. Cependant, plusieurs de ces études ont été réalisées en utilisant, soit du DON purifié dont il n'est pas certain qu'il se comporte comme le DON naturellement produit, soit des céréales fusariées pouvant contenir des associations de mycotoxines. Enfin, les références disponibles portaient souvent sur des contaminations élevées.

Or, les blés français, lorsqu'ils sont fusariés, présentent des concentrations relativement faibles, souvent inférieures à 750 µg/kg, et ne contiennent pas d'autre mycotoxine.

Une étude a donc été réalisée sur porcelets et porcs charcutiers afin de préciser les effets zootechniques et immunitaires du DON du blé aux faibles doses où il est susceptible d'être rencontré dans les conditions françaises.

## Deux essais sur porcelet et porc charcutier

### Les matières premières

Deux essais ont été conduits dans les stations expérimentales d'ARVALIS à Pouline (41) et de l'ITP à Villefranche de Rouergue (12) afin de comparer l'effet de 4 niveaux d'incorporation de 0 à 71 % d'un même lot de blé fusarié contaminé en DON, en post sevrage (2<sup>ème</sup> âge) et en engraissement.

Un lot contaminé de 16 tonnes de blé de la récolte 2001 a été échantillonné et analysé à la station d'ARVALIS à Boigneville (91), dans une étude visant à mesurer l'effet du nettoyage sur la teneur en fusariotoxines du blé (voir encadré). Le nettoyage a permis d'obtenir une réduction de la teneur en DON du lot utilisé de 25 %. En effet, la contamination finale en DON du blé (1200 µg/kg), est inférieure à celle du blé non nettoyé (1550 µg/kg) alors que les poussières et résidus de nettoyage sont très contaminés.

Les dosages des autres mycotoxines montrent une teneur basse en zéaralénone de 125 µg/kg et l'absence de tout autre trichothécène de type A et B, ou d'ochratoxine.

*\*ARVALIS – Institut du Végétal*

## Résumé

Deux essais ont été conduits afin d'étudier en 2<sup>ème</sup> âge et en engraissement les effets de la consommation de blé naturellement contaminé en déoxynivalénol (DON) dans l'aliment. Les performances ont été mesurées, après la phase d'alimentation 1<sup>er</sup> âge, et entre 29 et 107 kg en engraissement. La consommation journalière et le gain quotidien ne diffèrent pas significativement à l'exception des porcs recevant en engraissement 280 µg/kg de DON par rapport à ceux recevant 840 µg/kg. Dans les deux essais, les indices de consommation ne sont pas significativement influencés par les régimes. La concentration sérique en IgA, IgG, IgM et la capacité de prolifération des lymphocytes des porcelets ne sont pas modifiées par l'aliment. L'étude confirme l'absence d'effet notable de faibles doses de DON sur les paramètres zootechniques et immunitaires des porcs.

Eric ROYER  
François GROSJEAN\*



**Tableau 1 - Composition et valeurs prévisionnelles des aliments 2<sup>ème</sup> âge**

DON (µg/kg)	0	280	560	840
<b>Composition (%)</b>				
Blé sain	72,8	51,1	29,4	7,6
Blé fusarié		21,0	42,0	63,0
T. soja 48	22,5	23,2	23,9	24,7
minéraux et ac. aminés	4,7	4,7	4,7	4,7
<b>Valeurs de formulation (g ou MJ/kg)</b>				
Matière sèche	871	870	868	866
Matières azotées totales	182	182	182	182
EN MJ	9,62	9,58	9,54	9,50
Lysine totale	12,6	12,1	12,1	12,1
Lysine digestible	11,0	11,0	11,0	11,0
Lys d / EN	1,14	1,15	1,15	1,16

**Tableau 2 - Composition et valeurs prévisionnelles des aliments d'engraissement**

DON (µg/kg)	0	280	560	840
<b>Composition (%)</b>				
Blé sain	77,7	53,7	28,4	3,0
Blé fusarié		23,6	47,1	70,7
T. soja 48	15,3	16,0	17,7	19,3
Huile soja			0,40	0,85
minéraux et ac. aminés	7,1	6,7	6,5	6,2
<b>Valeurs de formulation (g ou MJ/kg)</b>				
Matière sèche	886	878	871	864
Matières azotées totales	162	160	160	160
EN MJ	9,93	9,90	9,90	9,90
Lysine totale	9,96	9,96	9,98	9,98
Lysine digestible	9,11	9,11	9,12	9,10
Lys d / EN	0,92	0,92	0,92	0,92

Quatre aliments 2<sup>ème</sup> âge et quatre aliments croissance ont été formulés à 0, 280, 560 et 840 µg/kg de DON, et fabriqués à Boigneville et Villefranche. Les formules respectives présentent une concentration énergétique de 9,6 et 9,9 MJ EN par kg d'aliment et un taux de lysine digestible de 1,15 et 0,9 g par MJ EN. Elles respectent des minima méthionine / lysine 30 %, méthionine + cystine / lysine 60 %, thréonine / lysine 65 %, tryptophane / lysine 18 % (tableaux 1 et 2).

En post sevrage, les aliments 2<sup>ème</sup> âge ont été apportés à volonté au

nourrisseur en granulés à l'issue de la période 1<sup>er</sup> âge. En engraissement, les aliments ont été apportés à volonté aux animaux pendant la totalité de l'essai et distribués à l'auge en farine humidifiée.

### Les animaux

L'essai en 2<sup>ème</sup> âge à Pouline a porté sur un nombre total de 90 porcelets, en 2 bandes, mis en lots 13 jours après le sevrage, au poids de 11 kg et placés pour 4 semaines en loges individuelles.

L'essai en engraissement à Villefranche a porté sur 120 porcs, mis

en lots à 29,3 kg, logés en cases de 5 animaux homogènes, à raison de 2 cases par régime.

Lors des deux essais, les animaux ont été pesés en début d'essai puis tous les 14 jours. La consommation des porcelets a été relevée après 14 et après 28 jours d'essai. Les quantités d'aliments distribués en engraissement ont été notées quotidiennement. Des notations de fèces ont également été réalisées à 4 reprises lors du post sevrage, puis de l'engraissement.

A la fin de la 1<sup>ère</sup> bande de l'essai 2<sup>ème</sup> âge, des prélèvements de sang ont été effectués sur tous les animaux, afin de doser les concentrations en immunoglobulines de type A, G, et M, et pour mettre en culture des cellules sanguines afin de mesurer la prolifération des lymphocytes en l'absence ou avec stimulation ainsi que leur production de deux cytokines (IL 4 et IFN-γ).

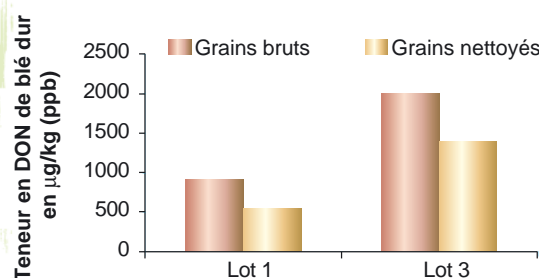
### Le nettoyage des grains améliore la qualité sanitaire des céréales

Les grains les plus fusariés dans un lot de céréales sont les plus contaminés en DON mais aussi les plus petits en taille. Aussi, le nettoyage des grains dès la réception à l'aide d'un nettoyeur - séparateur élimine les poussières et les plus petits grains fusariés. Cette opération permet de réduire d'environ 40 % la contamination en DON d'un lot de grain.

L'élimination des impuretés et des grains brisés permet également un remplissage plus homogène des cellules en évitant la ségrégation de ces éléments, facilite une bonne ventilation et rend plus difficile la colonisation par les insectes.

Par contre, les produits triés sortant du nettoyeur sont beaucoup plus pollués et ne doivent pas être utilisés.

Source : d'après G. Niquet, Arvalis. Perspectives agricoles n°300, avril 2004.



### Pas d'effets sur la consommation, ni sur les paramètres immunitaires

La composition chimique des aliments est conforme aux valeurs de formulation. Les analyses de DON sur les aliments fabriqués (0, 440,



950, et 1400 µg/kg pour l'essai à Pouline ; 0, 330, 700, et 1100 µg/kg pour l'essai à Villefranche) sont relativement supérieures aux valeurs attendues. Cependant, compte tenu du plus grand nombre d'analyses effectué sur le lot de blé fusarié, il a été décidé de retenir les teneurs prévisionnelles des aliments soit 0, 280, 560 et 840 µg/kg pour les deux essais.

Aucun phénomène de vomissement n'a été observé lors des deux essais. Les pathologies observées pendant les périodes d'élevage sont classiques et affectent tous les régimes.

La notation de l'aspect des fèces n'a montré aucune différence entre régimes lors des deux essais.

Lors de l'essai 2<sup>ème</sup> âge, la teneur en DON de l'aliment n'a pas eu d'effet significatif sur la consommation des porcelets pour l'ensemble de la période, comme pour chacune des deux quinzaines de l'essai. La vitesse de croissance des animaux, comme leur indice de consommation ne sont pas affectés (tableau 3).

Les prélèvements sanguins effectués sur les porcelets montrent que la concentration sérique en 3 classes d'immunoglobulines (IgA, IgG, IgM) n'est pas modifiée selon l'aliment. La stimulation par deux agents mitogènes (concanavaleine A et PMA + Ionomycine) aboutit à une forte prolifération lymphocytaire mais sans différences entre les régimes. Enfin, le régime alimentaire n'a aucune influence sur la production de cytokines, avec ou sans stimulation.

En engraissement, aucune différence de consommation n'apparaît entre les quatre régimes pendant la période de croissance. Pour la période de finition et pour l'ensemble de la durée d'engrais-

**Tableau 3 : Performances zootechniques et d'abattage des essais**

DON (µg/kg)	0	280	560	840	ETR (1)	Stat. (2)
<b>Essai 2<sup>ème</sup> âge Pouline</b>						
Poids initial, kg	11,3	11,3	11,3	11,3		
Poids final kg	27,1	27,1	27,1	27,9		
Consommation, g/j	906	917	878	918	133	ns
G.M.Q., g/j	563	563	563	585	78	ns
I.C.	1,63	1,66	1,57	1,59	0.11	ns
<b>Essai engraissement Villefranche</b>						
Poids initial, kg	29,3	29,3	29,3	29,3		
Poids abattage, kg	107,8	104,9	107,6	108,2		
Consommation, g/j	2330 <sup>ab</sup>	2274 <sup>b</sup>	2370 <sup>ab</sup>	2452 <sup>a</sup>	0,09	T*, S**
G.M.Q., g/j	838 <sup>ab</sup>	815 <sup>b</sup>	856 <sup>ab</sup>	862 <sup>a</sup>	56	T*, B*
I.C.	2,80	2,79	2,74	2,85	0,12	S*
Rendement, %	77,6	77,4	77,7	77,6	1,37	S**, B*
T.V.M.	60,0	60,4	60,3	59,8	1,90	S***

(1) Ecart type résiduel

(2) T: traitement, S : sexe, B : bloc; \* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001 ; ns : non significatif

sement, les animaux recevant 840 µg/kg de DON ont une consommation journalière d'aliment significativement supérieure à celle des animaux recevant 280 µg/kg de DON.

Les vitesses de croissance en engraissement ne sont pas affectées par la teneur en DON des aliments, à l'exception d'un GMQ supérieur pour le traitement 840 µg/kg par rapport au traitement à 280 µg/kg. Enfin, il n'y a pas eu d'effet de la teneur en DON sur l'efficacité alimentaire, ni sur l'ensemble des critères d'abattage (tableau 3).

### Les blés faiblement contaminés peuvent être utilisés

L'appellation de vomitoxine (FORSYTH et al, 1987; PESTKA et al, 1987; PRELUSKY et TRENHOLM, 1993) parfois attribuée au DON en relation avec les vomissements consécutifs à l'ingestion de doses très élevées apparaît impropre avec les doses habituellement rencontrées. Des concentrations en DON de 0, 280, 560 ou 840 µg/kg dans les aliments 2<sup>ème</sup> âge n'entraînent que des différences de

consommation, de croissance et d'indice de consommation faibles et non significatives. En engraissement, les mêmes teneurs de DON ne dégradent pas les performances zootechniques, ni les résultats d'abattage des porcs charcutiers. Plusieurs hypothèses peuvent partiellement expliquer les écarts de performances zootechniques intervenus lors de l'essai d'engraisement, sans relation avec la teneur en DON des régimes. Ainsi, les différences d'homogénéité de la teneur en DON de l'aliment ont pu, malgré les précautions prises, induire une ingestion du DON à des périodes différentes par les animaux. Les écarts constatés de densité de l'aliment ont pu influencer le comportement alimentaire des animaux dans le cas particulier d'une distribution en farine humidifiée. Enfin l'hétérogénéité de la réponse animale au DON pourrait intervenir en relation avec la variabilité élevée des performances zootechniques lors de l'essai (les écarts-types sont respectivement de 52, 83, 72 et 61 g de GMQ pour les traitements 0, 280, 560 ou 840 ).

La bibliographie est peu nombreuse et doit être utilisée avec

**Les teneurs faibles en DON n'ont pas dégradé les performances zootechniques.**

**L'appellation de vomitoxine parfois attribuée au DON apparaît impropre avec les doses habituellement rencontrées.**



prudence. En effet, le dosage du DON se caractérise par une mauvaise reproductibilité inter-laboratoires, ce qui peut conduire à une quantification et à une interprétation erronée de l'effet de la toxine (RAIMBAULT et al, 2002). Par ailleurs, les effets du DON peuvent être différents selon que l'on utilise du DON purifié ou des céréales naturellement contaminées par le DON seul ou également par d'autres mycotoxines, alors que le blé français ne semble concerné que par le DON (LEUILLET, 2002 ; GROSJEAN et al, 2003a).

Néanmoins, les études précédentes apparaissent cohérentes avec notre étude. Ainsi la consommation de porcelets de 13 kg n'est pas affectée par un aliment contenant 800 µg/kg de DON distribué pendant 28 jours (ROTTER et al, 1994). Un aliment dosant 600 µg/kg de DON n'influence pas non plus la consommation de porcelets de 21 kg sur 4 semaines (FRIEND et al, 1982). Par contre, avec une teneur plus élevée de 1100 µg/kg dans l'aliment pendant 32 jours, une diminution de la consommation (-7,9 %) et du GMQ (- 40 g) est mesurée par PRELUSKY et al (1994) chez des porcs de 22 kg. Un essai précédent de 4 semaines réalisé à la station ARVALIS de Pouline sur 90 porcelets de 11,5 kg montre par rapport à un témoin non contaminé, des diminutions de 3,5, 5,8 et 18 % de la consommation des animaux, proportionnelles à la teneur en DON des régimes (0, 720, 1440 et 2880 µg/kg), mais la différence de consommation de l'aliment contenant 720 µg/kg de DON n'est pas significative (GROSJEAN et al, 2003b).

Les réductions de la consommation des porcs de 42 kg, obtenues par FRIEND et al (1982) avec des

concentrations en DON de 300, 600, 900 µg/kg, sont respectivement de 3,1, 2,2 et 1,2 % par rapport à un témoin négatif. Cette baisse est limitée à 0,5 % entre 21 et 100 kg avec un aliment contenant 700 µg/kg de DON dans une étude de BERGSJØ et al (1993). Enfin, HOUSE et al (2002) mesurent une réduction de consommation de 3,8 % entre 22 et 110 kg avec un aliment contenant 1000 µg/kg de DON à base d'orge contaminé mais ne relèvent aucun effet lors de deux autres essais (HOUSE, 2003).

A partir des résultats de 94 essais sur porcelets et porcs charcutiers, DÄNICKE et al (2002) estiment à 4 % la réduction de la consommation d'aliment chaque fois que la concentration en DON est augmentée de 1000 µg/kg, mais constatent qu'il n'est pas possible d'établir une correspondance claire lorsque la concentration en DON est inférieure à 1000 µg/kg. De même, à partir de résultats principalement obtenus dans l'Est du Canada, HOUSE (2003) estime à 7,5 % la réduction de l'ingestion d'aliment pour chaque unité de 1000 µg/kg mais les teneurs inférieures à 1000 µg/kg expliquent peu la régression. Des travaux supplémentaires apparaissent nécessaires avant de préciser la nature linéaire ou non linéaire de la relation entre la contamination en DON et l'ingestion.

En résumé, il semble donc possible de conclure à l'absence d'effet important sur la consommation d'une teneur faible en DON de l'aliment ou à un effet trop faible pour pouvoir être mis en évidence par les essais.

Sur le plan immunologique, les aliments utilisés dans l'essai 2<sup>ème</sup> âge n'ont pas eu d'effet notable. Il conviendrait cependant d'étudier

les situations telle qu'une vaccination ou une infection où le système est stimulé, avant de conclure à l'absence d'effet de faibles concentrations de DON (GROSJEAN, 2003b). Des teneurs plus élevées sont nécessaires pour observer une modification des paramètres immunitaires (GROSJEAN et al, 2002 ; PINTON et al, 2004).

Bien que les analyses restent peu nombreuses, on peut estimer que les contaminations supérieures à 1000 µg/kg de DON dans les blés français restent rares. L'enquête ARVALIS - ONIC pour les années 2000, 2001, 2002 montre que respectivement 2,5 %, 0% et 4,2 % des mélanges régionaux variétaux nettoyés ont une teneur en DON supérieure à 1000 µg/kg. Des teneurs faibles ou moyennes sont également constatés par la firme service INZO pour les mêmes années (cité par PUYBASSET, 2003). Les données européennes SCOOP (Commission européenne, 2003) indiquent pour 4744 échantillons collectés sur la période 1997-2002 dans l'Union européenne, 4,3% d'échantillons de blé dont la teneur en DON est supérieure à 1000 µg/kg et 2,5 % de teneur supérieure à 1500 µg/kg.

Cette faible contamination des récoltes de blé entraîne une consommation peu fréquente de lots contaminés par les porcs.

**Une réglementation fixant des teneurs maximales en DON pour l'alimentation humaine est actuellement en préparation dans l'Union européenne.** En alimentation porcine, il apparaîtrait prudent de s'en tenir actuellement à de simples recommandations d'utilisation et d'acquérir des connaissances plus précises sur les effets zootechniques et sanitaires du DON en relation avec le degré de

**Sur le plan immunologique, les aliments utilisés dans l'essai 2<sup>ème</sup> âge n'ont pas eu d'effet notable.**



contamination avant de décider de l'opportunité d'une réglementation sur les conditions d'incorporation de céréales contaminées dans les aliments.

Les recommandations canadiennes de 1990 indiquent que des aliments dont les teneurs en DON sont inférieures à 1000 µg/kg peuvent être utilisés chez les porcs et porcelets (CFIA, 1990). Certains auteurs canadiens estiment que ces recommandations pourraient être revues à la hausse (HOUSE, 2003). Parallèlement, les recommandations maximales en DON sont fixées à 2000 µg/kg dans les rations pour porcs au Canada (CHARM-

LEY et TRENHOLM, 2000) et à 5000 µg/kg dans les grains et issues ne dépassant pas 20 % de la ration aux Etats Unis (FDA, 1993, cité par TRIGO-STOCKLI et HERRMAN, 2000). En Allemagne les recommandations du DLG (2000) portent sur une teneur maximale de 1000 µg/kg de DON dans tous les aliments pour porcs.

## Conclusion

La présence de DON dans les aliments, à faible concentration (< 800 µg/kg) n'a pas entraîné de réduction de la consommation des porcelets et des porcs charcutiers, ni de modification des paramètres

immunitaires. Il apparaît donc possible d'alimenter des porcs avec des régimes mono céréales contenant des blés fusariés, sans diminution importante des performances zootechniques, ni modification du statut immunitaire. La présence de DON entraîne principalement une perte économique correspondant à une réduction des performances de consommation et de croissance de 4 % par unité de 1000 µg/kg dans l'aliment complet. Enfin, des études complémentaires apparaissent indispensables en particulier avec d'autres céréales (maïs, orge, triticale, ..) et avec des lots présentant une contamination en plusieurs mycotoxines. ■

**La présence de DON entraîne principalement une perte économique.**

## Contacts :

eric.royer@itp.asso.fr

f.grosjean@arvalisinstitutduvegetal.fr

## Références bibliographiques

- BERGSJØ B., LANGSETH W., NAFSTAD I., HØGSET JANSEN J., LARSEN H.J.S., 1993. Vet. Res. Commun. 17, 283-294.
- CFIA, 1990. Mycotoxins in livestock feeds. Trade memo T-3-116. Canadian Food Inspection Agency. Ottawa, Ontario.
- CHARMLEY L.L., TRENHOLM H.L., 2000. Fiche de renseignement - Les Mycotoxines. Agence canadienne d'inspection des aliments, novembre 2000. <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/feebet/quelnew/mycof.shtml>.
- COMMISSION EUROPÉENNE, 2003. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states, Task 3.2.10. Reports on tasks for scientific cooperation, april 2003. Direction Générale de la Santé et de la protection des consommateurs, Bruxelles.
- DÄNICKE S., 2002. Lohmann Information Letter, 27, 1-9. [http://www.lah.de/fachinfos/lohmann info/englisch/l i 27 article 5 pdf](http://www.lah.de/fachinfos/lohmann%20info/englisch/l%20i%2027%20article%205%20pdf).
- DLG (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e.V.), Mykotoxine: Vermeiden statt «bekämpfen», DLG, Frankfurt am Main, 5 p., <http://www.futtermittel.net/pdf/myko.pdf>.
- FORSYTH D.M., YOSHIZAWA T., MOROOKA N., TUIE J., 1977. Applied and Environmental Microbiology; 34 (5): 547-552
- FRIEND D.W., TRENHOLM H.L., ELLIOT J.I., THOMPSON B.K., HARTIN K.E., 1982. Can. J. Anim. Sci., 62, 1211-1222.
- GROSJEAN F., TARANU I., F. SKIBA, P. CALLU, OSWALD I., 2002. Journées Rech. Porcine, 34, 333-339.
- GROSJEAN F., CALLU P., PINTON P., SKIBA F., BARRIER-GUILLOT B., OSWALD I., 2003a. Journées Rech. Porcine, 35, 443-450.
- GROSJEAN F., PINTON P., CALLU F., OSWALD I., 2003b. Proc. VII Conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, 3-5 décembre 2003, A.F.P.P. (ed), Paris.
- HOUSE J., ABRAMSON D., CROW G., NYACHOTI M., 2002. Manitoba Swine Update, 14 (2), 1-4.
- HOUSE J., 2003. Manitoba Swine Seminar, 17, 11, 1-9. <http://www.gov.mb.ca/agriculture/livestock/pork/swine/bab17s00.html>.
- LEUILLET M., 2002. Perspectives Agricoles, 278, 24-26.
- PINTON P., ROYER E., ACCENSI F., MARIN D., GUELFY J.F., BOURGÈS ABELLA N., GRANIER R., GROSJEAN F., OSWALD I.P., 2004. Journées Rech. Porcine, 36, 301-308.
- PESTKA J.J. LIN W.S. MILLER E.R., 1987. Food and Chemical Toxicology, 25 (11), 855-858.
- PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L., 1993. Natural Toxins, 1(5), 296-302.
- PRELUSKY D.B., GERDES R.G., UNDERHILL K.L., ROTTER B.A., JUI PY., TRENHOLM H.L., 1994. Natural Toxins, 2, 97-104.
- PUYBASSET A., 2003. Réussir porcs, 94, p.19.
- RAIMBAULT J.M., ORLANDO D., GROSJEAN F., LEUILLET M., 2002. Perspectives Agricoles, 278, 32-35.
- ROTTER B.A., THOMPSON B.K., LESSARD M., TRENHOLM H.L., TRYPHONAS H., 1994. Fundamental and Applied Toxicology, 23, 117-124.
- ROTTER B.A., PRELUSKY D.B., PESTKA J.J., 1996. J. Toxicol. Environ. Health, 48, 1-34.
- TRIGO-STOCKLI D., HERRMAN T., 2000. Mycotoxins in feed grains and ingredients. MF-2061, 8 pp. KSU Cooperative Extension Service. Manhattan, Kansas.