HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物培養細胞の耐凍性増大過程　Ⅰ：キクイモ塊茎カルスの耐凍性増大に及ぼす２、４－Ｄの効果
Author(s)	菅原, 康剛; 酒井, 昭
Citation	低温科學. 生物篇, 34, 1-8
Issue Date	1977-03-15
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17822
Type	bulletin (article)
File Information	34_p1-8.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Yasutake SUGAWARA and Akira SAKAI 1976 Cold Acclimation Processes in Cultured Plant Cells I. Effect of 2, 4-D on the Cold Acclimation of Callus-Cultured Tuber Cells of Jerusalem Artichoke, *Helianthus tuberosus* L. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 34.*** (With English Summary p. 8)

植物培養細胞の耐凍性増大過程 I.

キクイモ塊茎カルスの耐凍性増大に及ぼす 2, 4-D の効果*

菅原康剛・酒井　昭

(低温科学研究所)

(昭和 51 年 11 月受理)

I. 緒　　言

植物の耐凍性増大，凍結障害機構に関する研究は主に自然条件下あるいは人工制御環境下にある植物を用いて行なわれてきた[1]。しかし植物の個体を扱う限りその耐凍性増大過程はきわめて多くの複雑な過程を経て進行するものと思われる[1,2]。例えば高等植物を個体としてみた場合栄養生理的には autotrophic であるので，お互に生理機能を異にした細胞や組織の協同作用によってこれらの過程が進行すると考えられる。このことは植物ホルモンの場合にもあてはまる[3-6]。現在これらの相互の作用を理解するための解析はほとんど行なわれていない。おそらくこの様に複雑な自然の材料に固執することはすべての細胞でおきている耐凍性増大の最も基本的な機構の認識のさまたげになると思われる。したがって植物細胞の耐凍性増大機構をより深く理解するためには，理想的には単細胞植物を用いるかあるいは高等植物であるならば植物を構成する細胞や組織を取り出し，出来るだけ明らかな環境条件下での耐凍性変動に伴う細胞の生理，生化学的な諸変化を明らかにしなければならない。

培養細胞を用いたこの種の研究は，比較的均一で大量の細胞を使って組成の明らかな培地中で，しかも厳密に制御された環境下で行なえるし，短時間で実験を繰り返すことができる利点がある。また比較的温和な方法で細胞成分を分離できる。この様な細胞で得られたより多くの情報は自然条件下でおこる植物の耐凍性増大や凍結障害の機構の解明の糸口を提供するものと思われる。

現在までに植物培養細胞(カルス)の耐凍性を増大させたという報告は Tumanov 等[7], 酒井ら[8], Bannier と Steponkus[9], Ogolevets[10] によってなされた。しかし Fuchigami 等[11] はミズキの, McCown 等[12] はカーネーションのカルスで耐凍性を高めることができなかった。おそらくこれらの研究では培養条件などの検討が不十分なのではないかと思われる。

著者らは最近キクイモ塊茎カルスを用いて培養細胞の耐凍性増大に必要な培養条件の検討とそれに伴う細胞の諸変化についての研究を進めてきた。本報ではカルスの耐凍性増大に及ぼす培地中の 2, 4-D の効果について報告する。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 1810 号

なお本文中で次の略号を用いた。

2, 4-D, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid; IAA, indoleacetic acid; TTC, triphenyltetrazolium chloride

II. 材料と方法

材料: 実験材料として当研究所附近に野生しているキクイモ, *Helianthus tuberosus* L. の塊茎を用いた。塊茎は11月末から12月にかけて収穫し水道水で洗浄後, 湿ったバーミキュライト中に埋め0～3°C で保存した。そして保存6ヵ月以内のものを適時取り出して使用した。この方法で保存された塊茎は6ヵ月以内に実験に使用されれば, 保存期間に関係なくほぼ再現性のある結果が得られることが知られている[13,14]。

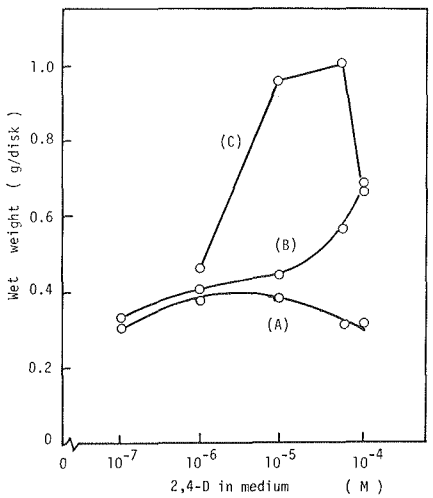
カルス誘導とその培養法: 使用に際して保存された塊茎を中性洗剤で十分に洗浄後, 約4%の次亜塩素酸塩（アンチホルミン）中で15分間殺菌し, さらに滅菌水で十分に洗浄した。つぎにナイフで塊茎表皮の部分を厚めに除き, 塊茎の中心部附近の組織を直径10 mmのコルクボーラーで打ち抜き, さらに厚さ約1 mmのスライス（以下ディスク）とした。カルス誘導と培養の培地組成は安田等の方法[14]に従った。すなわち得られたディスクを 10^{-7}～10^{-4} M の2, 4-Dを含む修正 Linsmaier-Skoog の寒天培地に置床し, 26°C の暗黒中でインキュベーションしカルスを誘導した。安田らによるとこの方法では置床後20～36時間の間にディスクの少なくとも70%の細胞が同調的に DNA の複製を行うという[14]。この培養条件で8日後, そのほとんどの細胞がカルス化したディスクを以下の実験に用いた。低温処理（ハードニング）はカルスの入ったコルベンを8°C あるいは0°C の恒温箱へ移しそこで一定期間培養した。

凍結融解: この様にハードニングされたカルスを培地上から取り出し, ろ紙で余分の培地を吸い取り6 cmのシャーレ上へ移し, そこで凍結融解した。凍結はつぎの様にして行った。カルスの入ったシャーレを −5°C の低温室中で約30分間冷却後植氷し, その温度で2時間冷却後 −10°C の恒温箱へ移した。さらに2時間おきに5°C づつ低い温度の恒温箱へ順次移した。各凍結温度で18時間おいたのち0°C の低温室で融解した。

生存率の判定: 融解後の細胞の生存率を TTC 還元法で判定した。TTC 還元法は Steponkus と Lanphear の方法[15]で行った。なお反応液中の Ortho X-77 の濃度は原報の半分の濃度に下げ, 反応は26°C で15時間行った。生存率は未凍結のカルスの TTC 還元量に対する凍結融解したカルスの TTC 還元量を % で表わした。

III. 結 果

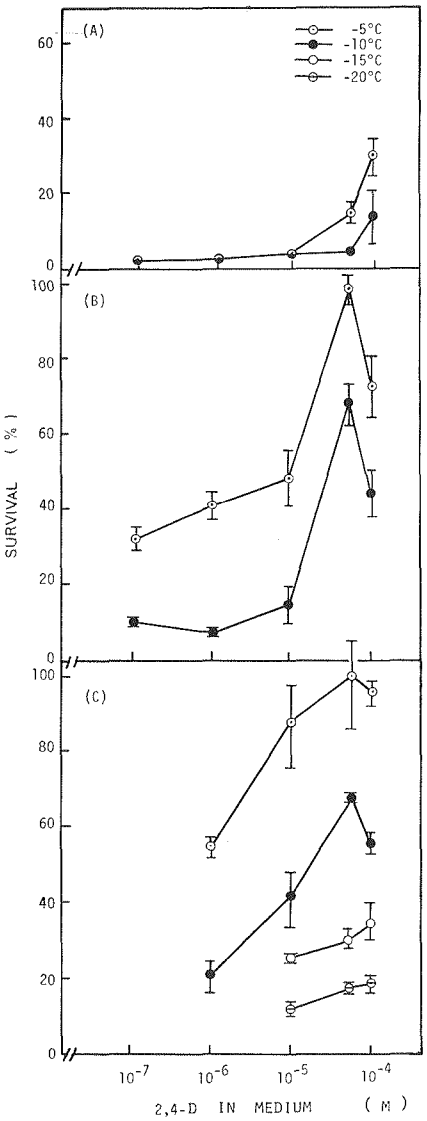
カルスの増殖に及ぼす 2, 4-D の効果: キクイモ塊茎組織からのカルス誘導にはオーキシンが不可欠で, オーキシンのない培地ではカルスは誘導されない[16]。塊茎組織のカルス化とその殖増に及ぼす2, 4-D濃度の効果について調べた。塊茎組織のディスクを各濃度の2, 4-Dを含む培地上で26°C, 暗黒中で8日間培養した後のディスク当りの生重量の変化を第1図（A）に示した。この結果からキクイモ塊茎組織のカルス誘導とその増殖の至適2, 4-D濃度は 10^{-6}～10^{-5} M 附近にある。この濃度は Yasuda 等[14]や Yeoman 等[16]の結果と一致する。なお 10^{-7} M の



第1図　カルス形成と増殖に及ぼす培地中の2,4-Dの効果

(A), 26°Cで8日間培養；(B), (A)をさらに8°Cで10日間，0°Cで8日間培養（ハードニング）；(C), (B)をさらに0°Cで20日間培養（ハードニング）

培養前のディスクの生重量は100 mg



第2図　各濃度の2,4-Dを含む培地で培養されたカルスの凍結融解後の生存率

(A), (B), (C)は第1図と同じ。凍結温度は図中に示した

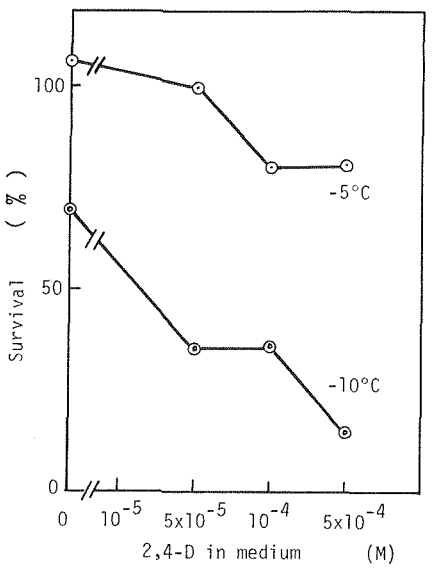
2,4-Dの培地においては，ディスク上に肉眼的に認められるカルスは誘導されず，見かけ上の生重量の増加は細胞の伸長 (expansion) による[14]。次に各濃度の2,4-Dをあたえたカルスのハードニング中の増殖について調べた。26°Cで8日間培養したカルスを8°Cで10日間，さらに0°Cで8日間ハードニングした。第1図(B)から明らかなように，10^{-5} M以上の濃度の2,4-Dを含む培地ではハードニング中でもカルスの増殖が認められ，2,4-Dの濃度が高くなるにつれて増殖量は大きくなった。0°Cでさらに20日間ハードニングすると10^{-5}ないし5×10^{-5}Mの2,4-Dでのカルスが最も増殖した（第1図，C)。このことはカルス増殖のために適当な2,4-D濃度が培養温度により異なっていることを示唆している。

ハードニングによるカルスの耐凍性の増加：8日間，各濃度の2,4-Dを含む培地で増殖したカルスについて$-5°$，$-10°$Cでの凍結融解後の生存率を調べた。10^{-7}～10^{-5} Mの2,4-Dで増殖したカルスはいずれの凍結温度でも生存率は低く数％以下であったが，培地中の2,4-Dの濃度が5×10^{-5}～10^{-4} Mと高くなるにつれてそこで増殖したカルスの生存率が増加する傾向にあった（第2図，A)。つぎにこれらのカルスをハードニングした。8°Cで10日間，さらに0°Cで8日間のハードニングによっていずれの濃度の2,4-Dで増殖したカルスにおいても凍結融解後のそ

れらの生存率は増加した。特に 5×10^{-5} M の 2,4-D で増殖したカルスの耐凍性の増加は最も著しく，−5°C で 100%，−10°C で約 70% の生存率を示した（第 2 図, B)。さらに 0°C で 20 日間ハードニングを続けると，この濃度の 2,4-D のカルスの耐凍性はあまり変動しなかったが，10^{-5} 及び 10^{-4} M の 2,4-D で増殖したカルスではわずかながらその耐凍性は増加した（第 2 図, C)。

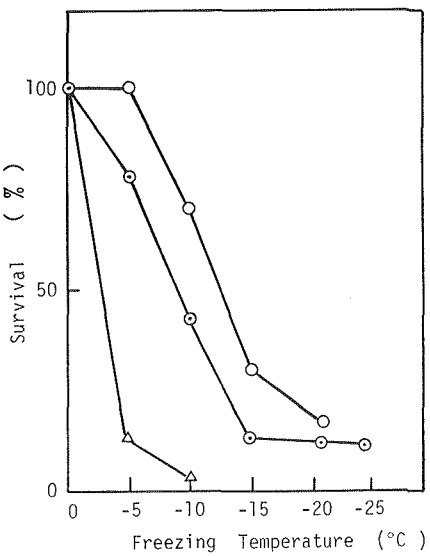
カルスの耐凍性増大に及ぼすハードニング中の 2,4-D の効果：第 2 図から明らかなように，ハードニングされていない各濃度の 2,4-D で増殖したカルスについてその耐凍性を比較すると 10^{-4} M の 2,4-D でのカルスのそれが最も高かった。しかしハードニング後に比較してみると，2,4-D 濃度は 5×10^{-5} M の方が 10^{-4} M よりもカルスの耐凍性を高めるのに効果があった。このことは高い濃度の 2,4-D はハードニング以前においてはカルスの耐凍性増大に対して促進的に働き，ハードニング中には逆に阻害的に働く可能性を示している。これを確かめるために次の実験を行った。すなわち 5×10^{-5} M の 2,4-D を含む寒天培地で 8 日間増殖したカルスを種々の濃度の 2,4-D を含む液体培地中で振盪しながら 0°C で 10 日間ハードニングした。なお別の実験でこの条件でも十分にカルスの耐凍性が増加することが明らかになっている。その結果を第 3 図に示した。ハードニング中の培地から完全に 2,4-D を除くとそこではカルスの耐凍性が最も高まり，2,4-D の濃度が高くなるに従い耐凍性の増加は阻害された。

塊茎組織とカルスの耐凍性の比較：照本によると札幌で越冬中のキクイモの塊茎の耐凍度は −10°C 附近にある[17]。そこで塊茎組織の耐凍性とカルスの耐凍性を比較した。収穫後 0°C で



第 3 図 カルスのハードニング中におこる 2,4-D の耐凍性増大に対する阻害

5×10^{-5} M の 2,4-D を含む培地で培養したカルスを使用。−5° 及び −10°C で凍結融解後の生存率を示す。ハードニングは各濃度の 2,4-D を含む液体培地中で 0°C で 10 日間振盪しながら行った



第 4 図 塊茎組織とカルスの耐凍度の比較

0°C で 3 ヵ月間保存した塊茎から塊茎組織をディスク（10 mm 直径，1 mm 厚さ）として調製しカルスと同条件で凍結融解。カルスは 5×10^{-5} M の 2,4-D を含む培地で培養したものを使用 −△−, 26°C で 8 日間培養したカルス；−○− 同じカルスを 8°C で 10 日間，0°C で 8 日間培養（ハードニング)；−⊙−, 塊茎組織

3カ月保存され十分にハードニングされた塊茎の組織からコルクボーラーでディスク（10 mm直径，1 mm厚さ）を調製し，カルスの場合と同様に凍結融解し，その生存率をTTC還元法で調べた。その結果を第4図に示した。十分ハードニングされた塊茎の組織では−5℃の凍結によってそのTTC還元量は低下し始め，−10℃附近で約50%の生存率を示した。カルスの生存率は5×10^{-5} Mの2,4-Dを含む培地で増殖し，ハードニングされたものについて示した。耐凍性の十分に高まったカルスの方が，ハードニングされた塊茎組織よりも明らかにその耐凍性は高かった。

IV. 考　　察

キクイモ塊茎カルスの増殖維持には培地中の2,4-Dの様なオーキシンが不可欠である[16]。このカルスの耐凍性の増加は培地中の2,4-Dの濃度によって大きく影響される。この2,4-Dの効果はカルスの26℃での増殖過程と，それにつづく低温培養（ハードニング）過程で異なっていることが今回の実験から明らかになった。すなわち26℃での培養過程ではカルス増殖のための至適濃度より高い濃度（5×10^{-5} M以上）の2,4-Dはカルスの耐凍性の増加に促進的に働くが，ハードニング中ではむしろ阻害的に働く（第2図，第3図）。

植物の耐凍性の増加と細胞内オーキシンの関係は現在までほとんど明らかにされていない。自然条件下の植物の耐凍性は季節的な変動を示す[1,2]が，その変動と各組織でのオーキシンの変動との関係も不明である。この耐凍性の季節的変動にはオーキシン以外の植物ホルモンも関与している[3-6]ことが示唆され，かなり複雑である。

現在までに細胞内オーキシン代謝に関係するパーオキシダーゼなどについて断片的な結果が得られている。McCownによってカーネーションを耐凍性が増加する様な条件でハードニングするとhardyな品種では新たなパーオキシダーゼのアイソザイムが出現することが報告されている[18]。またGerloffらによってもアルファルファではhardyやnonhardyな品種にかかわりなく細胞内パーオキシダーゼ活性がハードニングに際して増加することが明らかにされた[19]。しかしそれよりもかなり以前にTumanovとTrunovaによってハードニング中のアベナ子葉鞘中の細胞内オーキシンの動きが既に調べられている[20]。アベナの子葉鞘を12%のショ糖液中に浸してハードニングするとその耐凍性は十分高まるが，この時細胞内の結合型オーキシンと遊離型オーキシンのいずれの量も低下した。彼らは遊離型オーキシンが細胞の耐凍性の変動に関係すると考えている。もしハードニング中にこのショ糖液に10^{-3} MのIAAを加えると子葉鞘の耐凍性の増加は明らかにおさえられた。5×10^{-8} Mの2,4-Dもわずかながら阻害効果があった[20]。今回の実験でもハードニング中に培地中の2,4-Dの濃度を高くするとカルスの耐凍性の増加は阻害され，2,4-Dを除くとむしろそれは促進された（第3図）。矢島らによるとキクイモ塊茎切片を一定時間，2,4-D-^{14}C培地で培養した後に2,4-Dを含まない培地へ移すとエタノール可溶部（遊離の2,4-D）が組織から遊離し，エタノール不溶部の2,4-Dはカルスの形成とともに増加するという[21]。これらのことはハードニング中の細胞内オーキシン量の低下が細胞の耐凍性を高める方向へと作用している可能性を示している。しかしこのオーキシン量の低下は必ずしも単なるオーキシン活性の低下を意味していない。CoxとLevittによるとキャベツをハー

ドニングすると齢の進んだ下部の葉に比べ，より若い上部の葉の方が高い耐凍性を示し，この間後者の方が大きな生長量(葉面の増大)を示した。そしてこの生長は細胞の分裂よりもむしろ伸長であるという[22]。キクイモ塊茎カルスでも高い濃度の 2,4-D が存在するとハードニング中でも増殖がみられた（第1図）し，耐凍性もかなり高まった（第2図)。

山田らによるとキクイモ塊茎のカルス化（増殖）する過程でかなりの量（10^{-3} M オーダー）の 2,4-D が細胞内に蓄積するという[23]。また細胞内の主要な天然オーキシンである IAA とは異なり，2,4-D は細胞内では分解されにくく，いちじるしく安定であると考えられている。しかしキクイモ塊茎組織内での 2,4-D の transport は低温下ではいちじるしく低下するという[24]。今後キクイモ塊茎カルスのハードニングに際しての細胞内の 2,4-D の挙動を明らかにしなければならないが，以上の事実はかなり示唆に富んでいる。

今回初めて明らかになったキクイモ塊茎カルスの耐凍性増大過程での大きな特徴は，ハードニング前の 26°C の培養における高い濃度の 2,4-D はカルスの耐凍性の増加に促進的に作用することである。そしてむしろこの期間における比較的高濃度の 2,4-D はハードニングによってカルスの耐凍性を十分に高めるための不可欠な条件であるように思われる。低い濃度の2,4-D の存在下で培養されたカルスは同じ濃度の 2,4-D の培地でハードニングを続けてもその耐凍性が十分高まらないのはこのことを強く示唆している（第2図)。一般に植物培養細胞の増殖維持のためにはオーキシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンを外部から培地中へ加えておかなければならない。しかもこれらの植物ホルモンの種類や量のバランスによって培養細胞の様々な代謝活性や器官形成などが制御されている[16,25]。例えば根などの器官培養やカルスの培養ではオーキシンの供給は細胞の糖などの炭水化物の利用度を高めるし，カロチノイドなど多くの二次代謝産物の産生をも制御していることが多数知られている[25]。そして多くの場合，器官形成など細胞の形態的な変化に先立ち代謝系の変動がみられる[16,25]。おそらくキクイモ塊茎カルスの場合でも例外ではなく，高い濃度の 2,4-D があれば増殖中に細胞内の代謝系の変動がおきているものと思われる。そして変動した代謝系による産物が，その後のカルスの耐性凍の増加に貢献するのであろう。あるいはこの様な代謝変動に伴っておきた細胞の構造的な変化がその後のハードニングの過程で細胞の耐凍性の増大に役立つ様にさらに変化するのかもしれない。

一方 Matthysse 等はタバコの培養細胞において 2,4-D はクロマチンの鋳型活性を高めることを示し，細胞内の 2,4-D は遺伝子の transcription の段階で作用していることを指摘している[26]が，キクイモ塊茎カルスの耐凍性増大過程において 2,4-D はどの様なレベルで作用しているかは今後明らかにしなければならない問題である。

また今回明らかになった十分にハードニングされたカルスの耐凍性は天然の組織の耐凍性よりも高いという結果は，Bannier や Steponkus もキクのカルスでみているがその理由はまだ明らかでない。

V. 摘　　要

キクイモ，*Helianthus tuberosus* L. の塊茎カルスの耐凍性増大過程に及ぼす 2,4-D の効果について調べた。

カルスの耐凍性の増加は26°Cの培養と低温培養（ハードニング）の培地中の2,4-Dの濃度により大きく影響をうける。26°Cにおけるカルス増殖の至適2,4-D濃度は10^{-6}から10^{-5}M附近にあった。しかし耐凍性増大のための至適2,4-D濃度はそれよりも高く，5×10^{-5}Mであった。この濃度以上の2,4-Dで増殖したカルスはハードニングされなくともわずかながら耐凍性を保持していたが，さらにハードニングによってすみやかにその耐凍性は増加した。ハードニング中の培地中の高い濃度の2,4-Dはカルスの耐凍性の増加を明らかに阻害した。これらのことから培地中の2,4-Dは26°Cでの増殖過程と，ハードニング過程では，耐凍性増大のためにそれぞれ異なった働きをしていることが予想された。十分に耐凍性の高まったカルスはハードニングされた天然の塊茎組織よりもその耐凍性は高かった。

本実験をすすめるにあたり，キクイモ塊茎の保存法をはじめ培養法に関し様々な御助言を下さいました京都大学農芸化学教室の山田康之助教授，安田武司博士に感謝いたします。また終始，有益な御助言と技術的な援助を惜まれない当研究室の吉田静夫博士に深く感謝いたします。

文　献

1) Levitt, J. 1972 Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, N. Y. pp. 697.
2) Weiser, C. J. 1970 Cold resistance and injury in woody plants. *Science*, **169**, 1269–1278.
3) Irving, M. R. and Lanphear, F. O. 1967 Environmental control of cold hardiness in woody plants. *Plant Physiol.*, **42**, 1191–1196.
4) Irving, M. R. and Lanphear, F. O. 1967 The long day leaf as a source of cold hardiness inhibitors. *Plant Physiol.*, **42**, 1384–1388.
5) Fuchigami, L. H., Weiser, C. J. and Evert, D. R. 1971 Induction of cold acclimation in *Cornus stolonifera* Michx. *Plant Physiol.*, **47**, 98–103.
6) Fuchigami, L. H., Evert, D. R. and Weiser, C. J. 1971 A translocatable cold hardiness promotor. *Plant Physiol.*, **47**, 164–167.
7) Tumanov, I. I., Butenko, R. G. and Ogolevets, I. V. 1968 Application of isolated tissue technique for studying hardening process in plant cells. *Fiziol. Rast.*, **15**, 749–756.
8) Sakai, A. and Sugawara, Y. 1973 Survival of poplar callus at superlow temperatures after cold acclimation. *Plant & Cell Physiol.*, **14**, 1201–1204.
9) Bannier, L. J. and Steponkus, P. L. 1976 Cold acclimation of Chrysanthemum callus cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **101**, 409–412.
10) Ogolevets, I. V. 1976 Hardening of isolated callus tissue of woody plants with different frost hardiness. *Fiziol. Rast.*, **23**, 139–145.
11) Fuchigami, L. H. and Weiser, C. J. 1970 A technique for acenic culture and feeding of excised woody stems. *Plant Physiol.*, **46**, 845–846.
12) McCown, B. H. 1967 The influence of environment on enzyme components of *Dianthus* leaves, stem and callus cultures. Ph D Thesis, Univ. of Wisconsin. (cited in Ref. 9).
13) Yeoman, H. M. and Evans, P. K. 1967 Growth and differentiation of plant tissue cultures II. Synchronous cell divisions in developing callus cultures. *Ann. Bot.*, **31**, 323–332.
14) Yasuda, T., Yajima, Y. and Yamada, Y. 1974 Induction of DNA synthesis and callus formation from tuber tissue of Jerusalem artichoke by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant & Cell Physiol.*, **15**, 321–329.
15) Steponkus, P. L. and Lanphear, F. O. 1967 Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.*, **42**, 1423–1426.

16) Yeoman, H. M. and Aitchison, P. A. 1973 Growth patterns in tissue (callus) cultures. *In* Plant Tissue and Cell Cultures (H. E. Street, *ed.*), Blackwell Scientific Publication, Oxford, 240–268.
17) 照本 勲 1965 キクイモ塊茎の凍結について. 低温科学, 生物篇, **23**, 21–26.
18) McCown, B. H., Hall, T. C. and Beck, G. E. 1969 Plant leaf and stem proteins. II. Isozymes and environmental change. *Plant Physiol.*, **44**, 210–216.
19) Gerloff, E. D., Stahmann, M. A. and Smith, D. 1967 Soluble proteins in alfalfa roots as related to cold hardiness. *Plant Physiol.*, **42**, 895–855.
20) Tumanov, I. I. and Trunova, T. I. 1958 The influence of growth processes on the hardening of winter plant tissue. *Fiziol. Rast.*, **5**, 112–122.
21) 矢島康夫・安田武司・山田康之 1976 キクイモ塊茎からの脱分化における 2, 4-D 作用機構. 第 5 回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, p. 1.
22) Cox, W. and Levitt, J. 1969 Direct relation between growth and frost hardening in cabbage leaves. *Plant Physiol.*, **44**, 923–928.
23) 山田康之・大貝秀雄・安田武司・矢島康夫 1975 キクイモ塊茎切方へのオーキシンの吸収量とカルス誘導. 日本植物生理学会 1975 年会講演要旨集, p. 85.
24) 安田武司 私信.
25) Street, H. E. 1969 Growth in organized and unorganized systems. Knowledge gained by culture of organs and tissue explants. *In* Plant Physiology, Vol. VB (F. C. Steward, *ed.*), Academic Press, London, 3–181.
26) Matthysse, A. G. and Phyllips, C. 1969 A protein intermediary in the interaction of a hormone with genome. *Proc. Natl. Acad. Aci.* U.S., **63**, 897–903.

Summary

Effects of 2, 4-D on the cold acclimation of callus-cultured cells of Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus* L. were investigated.

The concentrations of 2, 4-D in culture media during growing and hardening were shown to be important factors for cold acclimation of the callus. Optimal concentration of 2, 4-D for callus growth at 26°C was 10^{-6} to 10^{-5} M. On the other hand, some of the cells in callus grown in the medium containing 2, 4-D at the concentration of 5×10^{-5} M or more could survive freezing down to −5 or −10°C even without cold hardening, and could be rapidly acclimated to low temperature during subsequent cold hardening. However the cold acclimation of callus which had once grown in culture medium containing 2, 4-D at 5×10^{-5} M was promoted or inhibited by either the lack or the presence of higher concentration of 2, 4-D in the cold hardening medium. These results suggest that 2, 4-D in the growing and cold hardening media have different roles on cold acclimation processes in callus culture. Nearly all the cells of callus well acclimated under culture conditions at low temperature were able to survive freezing down to −10°C. The cold hardiness of callus was apparently higher than that of tuber in fully hardened conditions.