

***ZmCCA1a* on Chromosome 10 of Maize Delays Flowering of *Arabidopsis thaliana***

**Yong shi<sup>1†</sup>, Xiyong Zhao<sup>3†</sup>, Sha Guo<sup>1</sup>, Shifeng Dong<sup>1</sup>, Yanpeng Wen<sup>1</sup>,  
Zanping Han<sup>4</sup>, Weihuan Jin<sup>2\*</sup>, Yanhui Chen<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>College of Agronomy/National Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China

<sup>2</sup>College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China

<sup>3</sup>Crop Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui, China

<sup>4</sup>College of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, China

**† These authors contributed equally to this work.**

**\* Correspondence:**

Yanhui Chen, Agricultural College, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China

e-mail: chy9890@163.com

Weihuan Jin, College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China

e-mail: Jinjinwh@163.com

**Keywords:** *maize*, *ZmCCA1*, overexpression, circadian rhythms, photoperiodic flowering





																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

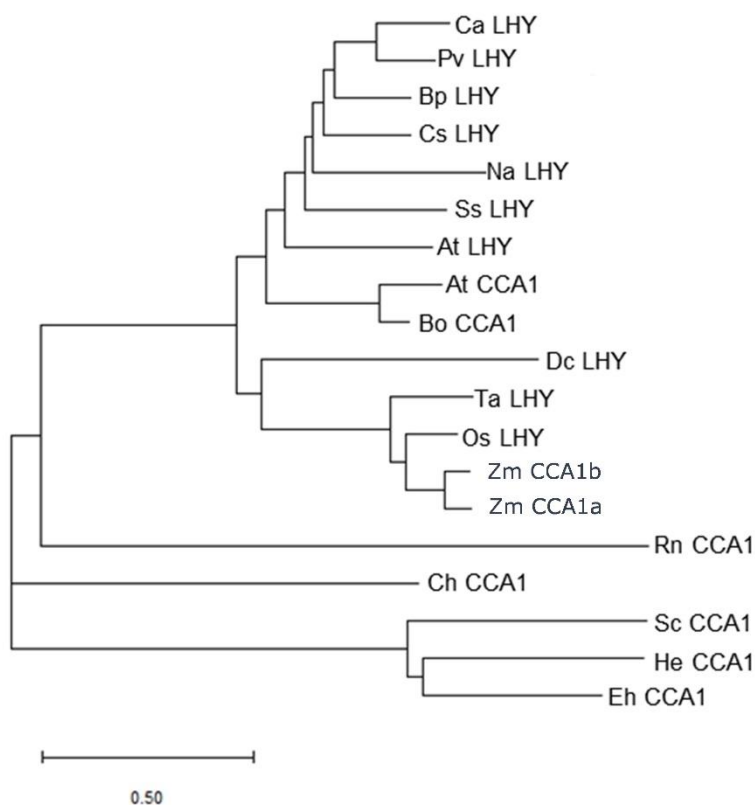
**Supplementary Figure 2** Sequence alignment of deduced amino acid sequence of ZmCCA1b in maize inbred lines CML288 and HZ4

Amino acid residues identical between ZmCCA1b in CML288 and HZ4 are highlighted in black. Conserved sequences of Myb domains of the *CCA1* and *CCA1-like* genes are enclosed in the red box. Arabic numerals at the right of the sequences show positions of the last amino acid residues of corresponding proteins indicated at the right.



	*	*	*
ZmCCA1a	MENVSSGEETVIKVRKPYTITKCRERWTEAEHKRFIFALKLYGRAWQRIEEHVGTAVQIRSHAQCKFFTKLEKEAINNG	80	
ZmCCA1b	MEMNSSGEETVVKVRKPYTITKCRERWTEAEHKRFIFALKLYGRAWQRIEEHVGTAVQIRSHAQCKFFTKLEKEAMNNG	80	
AtCCA1	MEINSSGELIVIKTRKPYTITKCRERWTEEEHNRFFIHALYLGRAWQKIEEHVATKTAVQIRSHAQCKFFSKVEKEAEAKG	80	
AtLHY	MDINTSGEELIAKARKPYTITKCRERWTEDEHERFIFALRYLGRAWQRIEEHIGTKTAVQIRSHAQCKFFTKLEKEAEVKG	80	
Consensus	m n sge k rkpytitkgrerwte eh rf eal lygrawq ieeh tktavqirshaqckff k ekea g		
ZmCCA1a	TSPGCAHLIDIPFRPKRKANSFYPRKSGLSSETFTKELPSLKSTKENMPLSNENVIMAGDASIQKFQPKKLSEKESCSCE	160	
ZmCCA1b	TSPGCAHLIDIPFRPKRKANSFYPRKSGLSSETCTKELPNLKSTKENMPLSNGHVMVGDAISIQNFQPKELSEKGSRSCE	160	
AtCCA1	VAMGCALLIAIPFRPKRKNENFYPRKTCGSTILMSKTGVNLGKESLGSEKVSHPFEMANEDRCQSKPEEK.....	151	
AtLHY	IPVCALLITEIPFRPKRKENTFYPRKFCNNGTSSSCVSSAKDAKLVSASSSCLNQAFILDLEKMPFSEKTSICKE....	156	
Consensus	qa di ippprpkrk n pyprk d k		
ZmCCA1a	VINLFRDAPSFSSSVNKSSSNHGAP..IEASKTKIRCDTIMENSINFMQLVKEINDQEMERINGTCISSKOEHSHE	238	
ZmCCA1b	VINLFRDAPSAFSSSVNKSSSNHGAPRRTEASKTESRDMSIMENNSFNENTQELVKVISDQEMERINGTCIRSKOEHSHE	240	
AtCCA1	.....LCFLNCSDCFTHQYLAAASSMNKSCIETSNA	182	
AtLHY	.....NQLENCSCVSTVNKYPIPTKQVSGDIETSKT	187	
Consensus	e s		
ZmCCA1a	CYLDISMCCMKLPESVETTDVCKQTARASHSLAEITGTISIPVTATEETHSVITSLCVGINGSMNPISHMFPAADPKFD	318	
ZmCCA1b	CYLDISTCCMKLMFKSVETTYVDECTARASHTLAESNGIASVPVTVEEGTHEDCQTSQCVGINGSMNPCIHFMVSALPKFG	320	
AtCCA1	STFR...EFIFSR...EEGSCNNRVKRKESNS..CLNAKSLENGNEQGCPITYE.....MHIFVLVPLG.....SSITS	241	
AtLHY	STVDNAVCLVFKKNKCLKGNDGTTVHSMQNYPWHFHACIVNGNIACPCNHESGMVSCDFMFHFMRREETHGHANLCATT	267	
Consensus			
ZmCCA1a	SSATPQCFFPHNYAAFAPMCCNCNCDTHRSLVNMSSTFSSMLVSTLLSNPAIHAAARIAASYWPAAEGNTPIDFNENLA	398	
ZmCCA1b	SSATPQCTFPHNYAAFAPMCCNCNCDTYRSFTNMSSTFSSMLVSTLLSNPAIHAAARIAASYWPAAEGNTPIDFNENPA	400	
AtCCA1	SLSHFSEFLSHFHTV.....AGDYQS.....FPNHIMSTILLCTPALYTAAATFASSFWFPL...SSGGSPFVPGNS	303	
AtLHY	SATTTASHQAFFACHS.....CDDYRSFIQISSTFSNLIMSTILLCNPAHAATAFAASVWPPYAASVGNSSGDSSTPMSS	339	
Consensus	s f still pa aa a swp		
ZmCCA1a	DGVQGRSIGSPFSMASIVAATVAASAASWWATQGLIPFEAEPMAFSFVPAPSAAFFTVDVPRPSEKLRDCPAENAQKECQE	478	
ZmCCA1b	DGVQGRNIGSPFSMASIVAATVAASAASWWATQGLIPFEAEPVAFPVAPSAAFFTVDVPRPSEKLRDCPVENAQNECQE	480	
AtCCA1	.....FPNLAAMAATVAASAASWWAANGLIPLCAP.....ISSGGFTSHFFSTFGPSCDVEYTKASTICHGVSQ	367	
AtLHY	S.....FPSITAIAATVAATAAWWASHGLIPVCAF.....APITCVFFSTVAVPTIAMTEMLTVENTIQPFQKON	404	
Consensus	pp aatvaasa awwa glip ap p		
ZmCCA1a	ARKQCQLEGFRVAASSEYDGSGKGEVSVHTELKISFPVQNADATSAAGALTTLAFMNKKKQDRSSCGSNTPSSSD...VDV	555	
ZmCCA1b	ARKQVCFEGLRVAASSEDGSGKGEVSLHTELKLSAQNADATPTTGACTNLAFRNKKKQDRSSCGSNTPSSSD...VDA	557	
AtCCA1	SREQEHSEASK..ARRSLDSEL.....VENKSKFVCHEQPSATFESLAKGSLGAGLRKQVDRSSCGSNTPSSSDCDEADA	440	
AtLHY	TALQDCNLASKSPAASSDSDSETGVTKLNACSKINDCKIEFVVVTAAVHLSNTAQKKNLVDRSSCGSNTPSGSD..AETDA	483	
Consensus	q a s d k drsscgsgntps sd d		
ZmCCA1a	DNVPEKEGNANEKAKQASCNSAGDTNHRFRSSGS.....TSDSWKEVSEEGRIAFAHALFSREKI PQSFSFPQAEQS	629	
ZmCCA1b	GNVPELEDNANEKAKQASCNSAGDTNHRFRSNGS.....TSDSWKEVSEEGRIAFAHALFSREKI PQSFSFPQAVDS	630	
AtCCA1	SERQHDGTNGEVKETNETDNKFTSESNAARRSRISN.....ITDEWKSVDSEGRIAFAHALFSREVLPQSFTYREEHR.	513	
AtLHY	LDKMKLKE.LVKETDE..NQFLVIELNNRKIKMRDNNNNNATSDSWKEVSEEGRIAFAHALFARERLPQSFSFPQVAE.	559	
Consensus	e k n r d wk vs egr af alf re lpgsf		
ZmCCA1a	KEVGKKEELEVTTVAVDLINKSTTSIDHLDLTIGEPRASF PNELSPLKIKLSRQTGFKPYKRCSEAKENRVFASD.....	703	
ZmCCA1b	KEVAKEEEDEVTTTAVDLINKNATSIDHDDLTMDEPRASF PNELSHLIKLSRRTGFKPYKRCSEAKENRVPTS.....	705	
AtCCA1	.EEEQQQEQCRYPMALDLINFATLTPVLDCEEKRNTEFIGIGLLASKLMSRGRTGFKPYKRCSEAKESTRILNNNFIHV	592	
AtLHY	.NVNRKQSLTSMFLAF..NFKSQDSCAADQE.....GVVMIGVTICKSLKTRQTGFKPYKRCSEMEVESQVGNIN..NQS	629	
Consensus	a n tgfkpykrce ke		
ZmCCA1a	.EVGTKRIRLSEAS	717	
ZmCCA1b	.MVGTKRIRLSEAS	719	
AtCCA1	EQKLEKRMRLTQAS	607	
AtLHY	DEKVOKRIRLEGEAS	644	
Consensus	kr rl as		





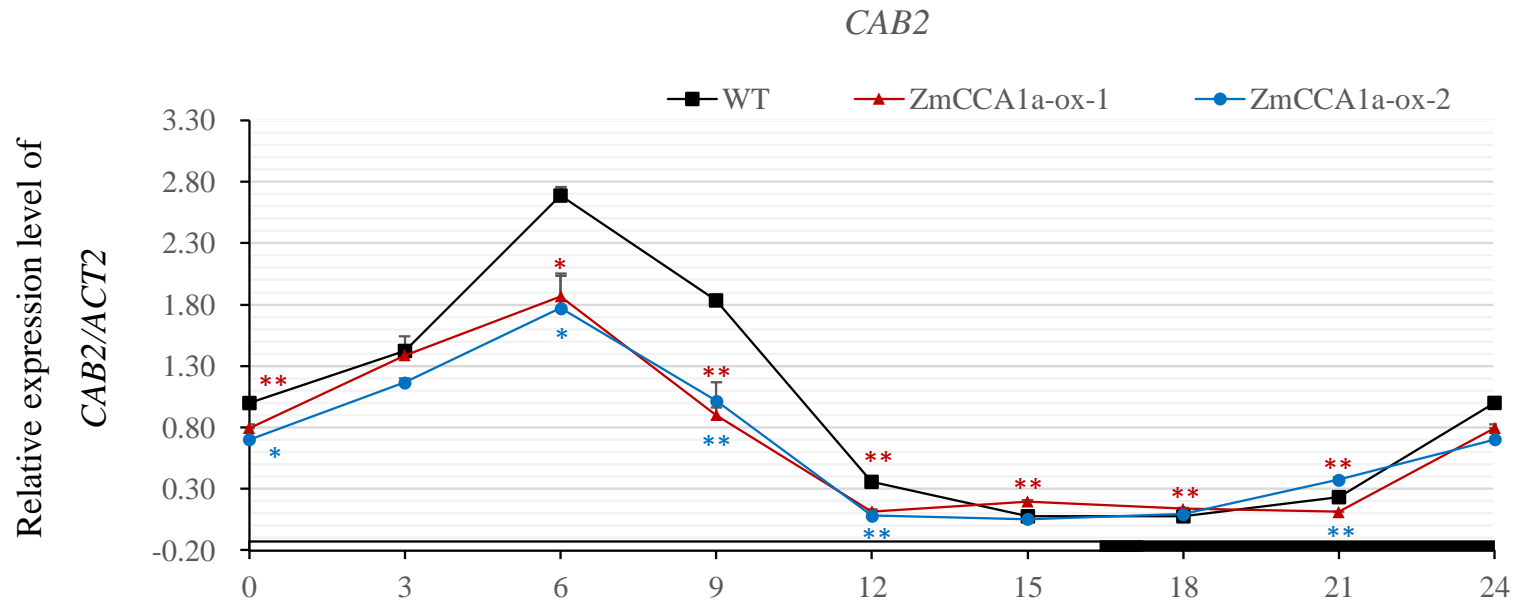
**Supplementary Figure 4** Phylogenetic analysis of ZmCCA1a and ZmCCA1b proteins from different organisms

Amino acid sequences were aligned using ClustalW and the phylogenetic tree was generated by the neighbor-joining method based on 1,000 bootstrap repetitions by MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>). The scale bar represents the estimated number of amino acid substitutions per site. The deduced amino acid sequences were downloaded from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Gene identifiers for the deduced amino acid sequences are: ZmCCA1b: Zm00001d049543; ZmCCA1a: Zm00001d024546; AtCCA1:819296; AtLHY: 839341; OsLHY: 4344703; CsLHY: 1187396845; BpLHY: 942430200; TaLHY: 320091615; CaLHY: 830260220; PvLHY: 21213868; SsLHYGI:1600707748; DcLHY: 1315698992; NaLHY: 1102143005; BoCCA1: 1047389776; RnCCA1GI: 2564001; ScCCA1: 1023944721; HeCCA1GI: 1178017302; EhCCA1: 1174014980; ChCCA1: 1129247100.

	*		
CNL288	CTCAATGTTGGTTGACCCACCTTGAGTTTGAGGGGTTGTTAGATGTATATAGATGGGTCTCTATGCTTTCTGTATTTCCCC	-457	
HZ4	CTCAATGTTGGTTGACCCACCTTGAGTTTGAGGGGTTGTTAGATGTATATAGATGGGTCTCTATGCTTTCTGTATTTCCCC	-457	
Consensus	ctca tgtggttgacccaccttgagtttgaggggttgtagatgtatatagatgggtctctatgctttctgtatttcccc		
CNL288	ATTGTATAAGTGGCTTAGTGCATATTTACAAGTGCTATTCATAACAGTAATTTACATTTCAAAGGAAGCACATGAATATT	-377	
HZ4	ATTGTATAAGTGGCTTAGTGCATATTTACAAGTGCTATTCATAACAGTAATTTACATTTCAAAGGAAGCACATGAATATT	-377	
Consensus	attgtataagtggcttagtgcataatttacaagtgcatttcataacagtaatttacatttcaaaggaagcacatgaatatt		
CNL288	*		
CNL288	TAAATGCTGTTTGCTCTATCTTAACGCTTTTATGCAGAGTAAGGACAATTGGATCAATTTAAGTAGGTGAGTGGAATTGAT	-297	
HZ4	TAAATGCTGTTTGCTCTATCTTAACGCTTTTATGCAGAGTAAGGACAATTGGATCAATTTAAGTAGGTGAGTGGAATTGAT	-297	
Consensus	taaatg tgttgctctatcttaacgcttttatgcagagtaaggacaattggatcaatttaagtaggtgagtggaattgat		
CNL288	CCTTTTGAAGTTTCTGACCCCAAGTTCAATTCTACAGGTTTTCTCGTGTAATTTGACACTACTTTGGCTGCTCTTTTAGG	-217	
HZ4	CCTTTTGAAGTTTCTGACCCCAAGTTCAATTCTACAGGTTTTCTCGTGTAATTTGACACTACTTTGGCTGCTCTTTTAGG	-217	
Consensus	ccttttgaagtttctgaccccagttcaattctacaggttttctcgtgtaaatttgacactactttggctgctcttttagg		
CNL288	TCTGGGCACACAAATTTGAAC TATTAACGCATTGGGAGTGCTTGTGTGTTAGAGGTCTAGGAGGAGCTATGAGGTACTAC	-137	
HZ4	TCTGGGCACACAAATTTGAAC TATTAACGCATTGGGAGTGCTTGTGTGTTAGAGGTCTAGGAGGAGCTATGAGGTACTAC	-137	
Consensus	tctgggcacacaaatttgaac tattaacgcattgggagtgcttgtgtgttagaggtctaggaggagctatgaggtactac		
CNL288	TTCCGTCAGGTCCAGCGTTTGTTGGAGATATGGAAGGAGGAGCTCTCTTGTTTATAGATGACCTCAACTCCAAGTGACA	-57	
HZ4	TTCCGTCAGGTCCAGCGTTTGTTGGAGATATGGAAGGAGGAGCTCTCTTGTTTATAGATGACCTCAACTCCAAGTGACA	-57	
Consensus	ttccgtcaggtccagcgtttggttggagatatggaaggaggagctctcttgtttatagatgacctcaactccaagtgaca		
CNL288	AAGTGAACAGCTGTTGAACTTCCCGTCTATTTCTGTTTCTTTTGGCTGGATTTGGA	-1	
HZ4	AAGTGAACAGCTGTTGAACTTCCCGTCTATTTCTGTTTCTTTTGGCTGGATTTGGA	-1	
Consensus	aagtgaacagctgttgaacttcccgctctatttctgtttcttttggctggatttgg		

**Supplementary Figure 5** Sequence alignment of *ZmCCA1a* primers in CML288 and HZ4

DNA sequences identical between *ZmCCA1a* primers in CML288 and HZ4 are highlighted in black. Asterisks indicate nucleotide diversity between the two DNA sequences. The numbers on the right indicate positions of the last nucleotide upstream of the translation initiation site ATG.



**Supplementary Figure 6** Diurnal oscillations in accumulation of *CAB2* transcripts in WT and *ZmCCA1a-ox* lines

*Arabidopsis* seeds were grown on MS plates under long days (LD) for 11 days. Seedlings (at least 10 plants for each line) were harvested at the start of ZT0 of day 12 and thereafter at 3-h intervals for 24 h. Experiments were performed three times with similar results. Relative transcript levels were normalized to the expression level of *CAB2* in the WT at ZT0. Expression levels of *CAB2* are shown as the average of three repeats. *ZmCCA1a-ox-1* and *ZmCCA1a-ox-2* indicate two lines of transgenic *Arabidopsis*. Day and night conditions are indicated with white and black bars on the horizontal axis. Error bars indicate standard error (n=3). Student's *t* test was used to analysis the significant differences in expression levels of target genes between WT and *ZmCCA1a-ox* lines. Significance levels of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  were marked with \* and \*\* (red for *ZmCCA1a-ox-1* and blue for *ZmCCA1a-ox-2*) , respectively.