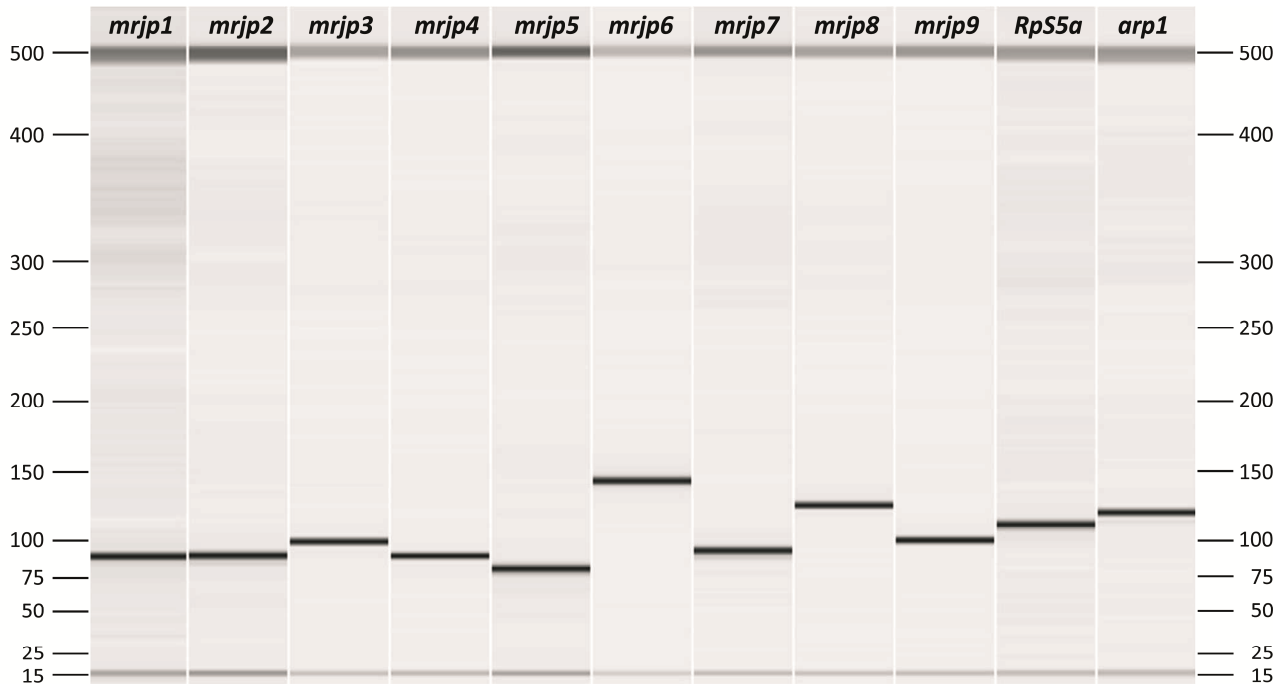


## Additional File 1

Buttstedt A, Moritz RFA & Eler S (2013): More than royal food - *Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera** – *Frontiers in Zoology*



**Figure S1:** Analysis of qPCR product specificity; *mrjp1* – 89 bp, *mrjp2* – 90 bp, *mrjp3* – 102 bp, *mrjp4* – 91 bp, *mrjp5* – 80 bp, *mrjp6* – 146 bp, *mrjp7* – 95 bp, *mrjp8* – 130 bp, *mrjp9* – 103 bp, *RpSa5* – 115 bp, *arp1* – 120 bp.



**Figure S2:** Two-way hierarchical clustering analysis heat map and dendrogram of *mrjp* gene expression data over all honeybee castes and groups. Branch lengths in dendrograms produced from cluster analysis correspond to the relative degree of similarity between branches. Differential gene expression is represented for all genes as a color gradient across all samples from deep blue (lowest) to light yellow (highest). The expression values were log transformed and visualized using MultiExperiment Viewer (MeV) version 4.9.

**Table S1:** Primer characteristics for qPCR. Primer sequences for *RpS5a* and *arp1* were adopted from Evans (2006) and Gregorc *et al.*, (2012).

Name		Primer Sequence (5'-3')	Size (bp)	Product T <sub>m</sub> (°C)	PCR efficiency	GenBank Gene ID
<b><i>mrjp1</i></b>	F	TGACATACATTACGAAGGAGTCCA	89	76.5	2.04	406090
	R	ATCCGAAGAAGAGAACGCCA				
<b><i>mrjp2</i></b>	F	CGTCCAATACCAAGGATCCGAA	90	78.0	2.01	406091
	R	ACAAGTCCGACGAAGAGGAC				
<b><i>mrjp3</i></b>	F	TGGACAGATGGCGTGATAAGAC	102	77.0	1.96	406120
	R	GAGGTCCACCTTTGCCCTTT				
<b><i>mrjp4</i></b>	F	AGACAAAATATCGATGTCGTAGCTC	91	77.0	2.04	406133
	R	TGCCAGATTGTGGAACGTTTT				
<b><i>mrjp5</i></b>	F	AGAAAATATGGATATGGTCGCTCAG	80	76.7	1.91	406116
	R	ATTGTGGGAGATGCATCATTTTCA				
<b><i>mrjp6</i></b>	F	ACAAAATATGGATATGGTCGCTCAG	146	75.0	1.90	406149
	R	TCTGCATTCTGTTACTTAAAGCCAA				
<b><i>mrjp7</i></b>	F	AGAAAATACCGATATGGTCGCC	95	76.0	2.01	409555
	R	CAATAATGACGATATGTGGGAGCA				
<b><i>mrjp8</i></b>	F	TGGACTCAAGCATCGGCTAA	130	79.0	1.99	406067
	R	TGGCAACCACTTCGATATTTCTT				
<b><i>mrjp9</i></b>	F	TCGGAAACTGGTGCTCTCTT	103	80.0	1.85	409873
	R	TGGCGACTATTTCAATATTCCTTCT				
<b><i>RpS5a</i></b>	F	AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	115	75.0	2.07	409728
	R	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA				
<b><i>arp1</i></b>	F	TTGTATGCCAACACTGTCCTTT	120	79.0	1.91	406122
	R	TGGCGGATGATCTTAATTT				

**Table S2:** Expression profile of a specific *major royal jelly protein* over all analyzed groups within honeybee body sections.

Relative <i>mrjp</i> gene expression within body sections																						
	Head							Thorax							Abdomen							
<b><i>mrjp1</i></b>	N <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	D <sup>c</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>c</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>c</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>c</sup>	N <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>b,c</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>c</sup>	C <sup>c</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>c</sup>	D <sup>c</sup>	D <sup>a</sup>	N <sup>a,b</sup>	F <sup>a,b</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a,b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b</sup>	
<b><i>mrjp2</i></b>	N <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b,c</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>c</sup>	D <sup>b,c</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>c</sup>	N <sup>a</sup>	F <sup>a,b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>a,b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b,c</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>b,c</sup>	D <sup>b,c</sup>	C <sup>c</sup>	N <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>a</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>a</sup>	D <sup>a</sup>	C <sup>a</sup>	
<b><i>mrjp3</i></b>	N <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	D <sup>c,d</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>d,e</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>d,e</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>e</sup>	N <sup>a</sup>	D <sup>a,b</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a,b</sup>	F <sup>a,b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>a,b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>a,b</sup>	C <sup>b</sup>	N <sup>a</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>b</sup>	D <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b</sup>	
<b><i>mrjp4</i></b>	N <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	D <sup>d</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>d</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>d</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>d</sup>	F <sup>a</sup>	N <sup>a,b</sup>	D <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b</sup>	D <sup>a</sup>	C <sup>a,b</sup>	N <sup>b,c</sup>	F <sup>b,c</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>b,c</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b,c</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>c</sup>	
<b><i>mrjp5</i></b>	F <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	D <sup>c</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>c,d</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>d</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>d</sup>	F <sup>a</sup>	D <sup>a,b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	N <sup>b</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b</sup>	F <sup>a</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>a</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>a</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a</sup>	D <sup>a</sup>	C <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	
<b><i>mrjp6</i></b>	F <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	D <sup>d</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>d,e</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>d,e</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>e</sup>	F <sup>a</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a,b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>a,b</sup>	N <sup>b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	D <sup>b</sup>	D <sup>a</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>a</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>a</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	C <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	
<b><i>mrjp7</i></b>	N <sup>a</sup>	F <sup>a,b</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>b,c</sup>	D <sup>b,c</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b,c</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>c,d</sup>	C <sup>d</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a</sup>	F <sup>a,b</sup>	N <sup>a,b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>a,b</sup>	D <sup>a,b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	D <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a,b</sup>	N <sup>a,b</sup>	C <sup>a,b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b</sup>	
<b><i>mrjp8</i></b>	D <sup>a</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>a,b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>a-c</sup>	F <sup>b,c</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>b,c</sup>	N <sup>b,c</sup>	C <sup>c</sup>	F <sup>a</sup>	N <sup>a,b</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a,b</sup>	D <sup>b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	N <sup>a</sup>	F <sup>a,b</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a,b</sup>	D <sup>a,b</sup>	C <sup>a,b</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>b</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>b</sup>	
<b><i>mrjp9</i></b>	F <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>b,c</sup>	N <sup>b-d</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>c,d</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>d</sup>	D <sup>d</sup>	F <sup>a</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	C <sup>b,c</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>c,d</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>d</sup>	D <sup>e</sup>	Q <sub>V</sub> <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>	C <sup>b,c</sup>	N <sup>c,d</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>d</sup>	Q <sub>P</sub> <sup>d</sup>	D <sup>d</sup>	

C, caged workers; N, hive nurses; F, foragers; D, drones; Q<sub>V</sub>, virgin queens; Q<sub>E</sub>, queens with eggs; Q<sub>P</sub>, queens with pupae. Data were analyzed with one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data that did not match normality untransformed, were log- or Box-Cox-transformed. <sup>a-e</sup>Gene expression of groups in the same row with different superscripts is significantly different ( $P < 0.05$ ). Genes are listed according to their mean expression values from large to small. Relative gene expression levels are given in Table 1 of the main manuscript and statistical details for all groups and genes in additional file 2.

**Table S3:** Expression profiles of all *major royal jelly proteins* in a specific group within honeybee body sections.

Relative <i>mrjp</i> gene expression within body sections																											
	Head									Thorax							Abdomen										
<b>C</b>	9 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	7 <sup>b,c</sup>	4 <sup>b-d</sup>	1 <sup>c,d</sup>	3 <sup>d,e</sup>	2 <sup>e</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	7 <sup>b,c</sup>	6 <sup>b,c</sup>	5 <sup>c,d</sup>	4 <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>	3 <sup>e</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	7 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup>	4 <sup>d</sup>	5 <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup>	3 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>
<b>N</b>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	5 <sup>b,c</sup>	7 <sup>b,c</sup>	4 <sup>b,c</sup>	6 <sup>c</sup>	9 <sup>d</sup>	8 <sup>e</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a,b</sup>	7 <sup>b,c</sup>	6 <sup>c,d</sup>	5 <sup>d,e</sup>	1 <sup>d,e</sup>	2 <sup>e</sup>	4 <sup>e</sup>	3 <sup>e</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	7 <sup>c</sup>	6 <sup>d</sup>	3 <sup>d,e</sup>	5 <sup>e,f</sup>	4 <sup>e,f</sup>	1 <sup>e,f</sup>	2 <sup>f</sup>
<b>F</b>	6 <sup>a</sup>	5 <sup>a,b</sup>	1 <sup>a,b</sup>	9 <sup>b,c</sup>	2 <sup>b,c</sup>	4 <sup>c,d</sup>	7 <sup>c,d</sup>	3 <sup>d</sup>	8 <sup>d</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	7 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	4 <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>	3 <sup>e</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	6 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>	4 <sup>e</sup>	2 <sup>f</sup>	3 <sup>f</sup>	1 <sup>f</sup>
<b>D</b>	8 <sup>a</sup>	7 <sup>a,b</sup>	6 <sup>a-c</sup>	5 <sup>b-d</sup>	9 <sup>c-e</sup>	4 <sup>d-f</sup>	3 <sup>e,f</sup>	1 <sup>f</sup>	2 <sup>f</sup>	8 <sup>a</sup>	7 <sup>a,b</sup>	6 <sup>b,c</sup>	5 <sup>b,c</sup>	9 <sup>b,c</sup>	4 <sup>c,d</sup>	3 <sup>d,e</sup>	2 <sup>d,e</sup>	1 <sup>e</sup>	8 <sup>a</sup>	7 <sup>a,b</sup>	9 <sup>a,b</sup>	6 <sup>b,c</sup>	1 <sup>c</sup>	4 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>
<b>Q<sub>V</sub></b>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	6 <sup>b,c</sup>	5 <sup>c,d</sup>	4 <sup>d,e</sup>	1 <sup>e,f</sup>	2 <sup>e,f</sup>	3 <sup>f</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	6 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>	4 <sup>e</sup>	3 <sup>f</sup>	1 <sup>f</sup>	2 <sup>f</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	6 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>	3 <sup>e</sup>	4 <sup>e</sup>	1 <sup>f</sup>	2 <sup>g</sup>
<b>Q<sub>E</sub></b>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	4 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	3 <sup>d</sup>	1 <sup>d</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a,b</sup>	7 <sup>a-c</sup>	6 <sup>b,c</sup>	5 <sup>c,d</sup>	4 <sup>d,e</sup>	2 <sup>d,e</sup>	3 <sup>e</sup>	1 <sup>e</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a,b</sup>	6 <sup>a-c</sup>	7 <sup>a-c</sup>	5 <sup>b-d</sup>	4 <sup>b-d</sup>	1 <sup>c,d</sup>	2 <sup>c,d</sup>	3 <sup>d</sup>
<b>Q<sub>P</sub></b>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	7 <sup>a,b</sup>	6 <sup>b,c</sup>	5 <sup>c</sup>	4 <sup>d</sup>	2 <sup>d,e</sup>	1 <sup>e,f</sup>	3 <sup>f</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	7 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	5 <sup>c</sup>	4 <sup>d</sup>	2 <sup>d,e</sup>	3 <sup>e</sup>	1 <sup>e</sup>	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a,b</sup>	6 <sup>b</sup>	7 <sup>b,c</sup>	5 <sup>c</sup>	4 <sup>d</sup>	3 <sup>d</sup>	2 <sup>d</sup>	1 <sup>d</sup>

C, caged workers; N, hive nurses; F, foragers; D, drones; Q<sub>V</sub>, virgin queens; Q<sub>E</sub>, queens with eggs; Q<sub>P</sub>, queens with pupae. Data were analyzed with one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. Data that did not match normality untransformed, were log- or Box-Cox-transformed. <sup>a-g</sup> Gene expression of *mrjps* in the same row with different superscripts is significantly different ( $P < 0.05$ ). Genes are listed according to their mean expression values from large to small. Relative gene expression levels are given in Table 1 of the main manuscript and statistical details for all groups and genes in additional file 2.

**Table S4:** Amino acid sequence identities of all *Apis mellifera* MRJPs and the single MRJPs of *Bombus terrestris* (GenBank: ADW82102.1), *Megachile rotundata* (GenBank: XP\_003708472.1), *Camponotus floridanus* (GenBank: EFN61808.1) and *Harpegnathos saltator* (GenBank: EFN81209.1). Sequence identities were determined using ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

	<i>B. terrestris</i>	<i>M. rotundata</i>	<i>C. floridanus</i>	<i>H. saltator</i>
Am_MRJP1	48.9%	46.1%	39.3%	36.3%
Am_MRJP2	48.9%	43.9%	39.3%	36.3%
Am_MRJP3	46.7%	44.6%	37.9%	35.8%
Am_MRJP4	42.6%	38.7%	33.7%	31.5%
Am_MRJP5	47.5%	43.6%	39.3%	36.3%
Am_MRJP6	46.2%	45.4%	40.6%	37.8%
Am_MRJP7	48.4%	46.1%	41.6%	38.0%
Am_MRJP8	52.3%	46.4%	44.0%	41.3%
Am_MRJP9	55.5%	49.6%	46.4%	44.0%