

Table S1. The reconstructed sequence of AncSR2. Ambiguously reconstructed sites with a posterior probability (PP) > 0.2 (grey shading) were introduced into the ML ancestor and their responses to 11-deoxycorticosterone and estradiol evaluated using a luciferase reporter assay.

AncSR2 reconstructed on 184-taxa ML tree																											
Reconstructed							Alt state							Reconstructed							Alt state						
Residue No.	Amino Acid	PP	1	PP	2	PP	Residue No.	Amino Acid	PP	1	PP	2	PP	Residue No.	Amino Acid	PP	1	PP	2	PP							
1	P	1.00					84	Y	1.00					167	E	1.00											
2	S	0.81	T	0.19	P	0.01	85	K	0.99	R	0.01	Q	0.00	168	L	1.00											
3	L	0.91	I	0.04	M	0.03	86	H	1.00					169	N	0.43	R	0.25	G	0.18							
4	I	0.78	V	0.21	M	0.00	87	T	0.82	A	0.07	V	0.06	170	R	0.66	K	0.34	Q	0.00							
5	S	0.94	T	0.05	A	0.01	88	N	1.00					171	A	0.68	V	0.31	T	0.01							
6	I	0.94	V	0.03	L	0.02	89	G	1.00	S	0.00			172	I	0.94	V	0.06									
7	L	1.00					90	Q	0.76	K	0.13	N	0.04	173	A	0.68	V	0.20	G	0.05							
8	Q	0.50	E	0.49	K	0.01	91	M	1.00	L	0.00			174	K	0.55	R	0.34	Q	0.06							
9	A	0.56	V	0.19	S	0.13	92	L	1.00					175	K	0.55	R	0.24	Q	0.14							
10	I	1.00					93	Y	1.00	F	0.00			176	E	0.98	D	0.02	Q	0.00							
11	E	1.00					94	F	1.00					177	N	0.85	K	0.08	G	0.04							
12	P	1.00					95	A	1.00					178	N	1.00	S	0.00	D	0.00							
13	E	0.99	D	0.01			96	P	1.00					179	S	0.53	T	0.24	A	0.16							
14	V	0.98	I	0.04	M	0.00	97	D	1.00					180	A	0.47	G	0.24	S	0.19							
15	V	0.98	I	0.02	L	0.00	98	L	1.00					181	Q	0.99	E	0.01									
16	Y	1.00	F	0.00			99	I	0.98	V	0.02			182	N	0.56	S	0.41	G	0.01							
17	A	1.00					100	F	1.00					183	W	1.00											
18	G	1.00					101	N	1.00					184	Q	1.00	H	0.00									
19	Y	1.00	F	0.00			102	E	1.00					185	R	1.00											
20	D	1.00					103	Q	0.63	E	0.36	D	0.01	186	F	1.00											
21	N	0.81	S	0.19	T	0.00	104	R	1.00					187	Y	1.00											
22	T	0.61	S	0.38	A	0.01	105	M	1.00					188	Q	1.00											
23	Q	0.97	R	0.02	H	0.00	106	Q	0.99	H	0.00	K	0.00	189	L	1.00											
24	P	1.00					107	Q	1.00					190	T	1.00											
25	D	0.95	E	0.04	M	0.00	108	S	1.00					191	K	1.00											
26	T	1.00					109	A	1.00	T	0.00	S	0.00	192	L	0.99	M	0.01									
27	T	0.99	S	0.01	A	0.00	110	M	1.00					193	L	1.00											
28	N	0.97	S	0.02	D	0.01	111	Y	1.00	F	0.00	H	0.00	194	D	1.00											
29	Y	0.80	H	0.19	R	0.01	112	D	0.73	E	0.27	N	0.00	195	S	1.00											
30	L	1.00	M	0.00			113	L	1.00					196	M	1.00											
31	L	1.00					114	C	1.00					197	H	1.00											
32	S	0.90	T	0.10	A	0.00	115	Q	0.48	L	0.18	M	0.09	198	D	0.97	E	0.03									
33	S	1.00	T	0.00			116	G	1.00					199	L	1.00	M	0.00									
34	L	1.00					117	M	1.00					200	V	1.00			S	0.00							
35	N	1.00					118	Q	0.48	R	0.48	H	0.02	201	G	1.00	E	0.00	N	0.00							
36	R	0.99	K	0.01	Q	0.00	119	Q	0.99	K	0.01	N	0.00	202	G	0.93	K	0.05									
37	L	1.00					120	I	1.00	V	0.00			203	L	1.00											
38	A	0.87	C	0.06	G	0.05	121	S	0.99	A	0.01	T	0.00	204	L	1.00											
39	E	0.85	G	0.13	D	0.02	122	Q	0.47	L	0.11	K	0.09	205	Q	0.99	E	0.01									
40	K	0.61	R	0.40			123	E	1.00	D	0.00			206	F	1.00											
41	Q	1.00					124	F	1.00					207	C	1.00											
42	L	0.77	M	0.23			125	V	0.87	I	0.07	M	0.03	208	F	1.00											
43	V	1.00	I	0.00			126	R	0.98	K	0.02	H	0.00	209	Y	0.60	H	0.30	N	0.07							
44	S	0.92	R	0.05	P	0.02	127	L	1.00					210	T	1.00											
45	V	1.00	I	0.00			128	Q	1.00					211	F	1.00											
46	V	1.00					129	V	0.97	L	0.03	I	0.01	212	V	0.99	I	0.01	M	0.01							
47	K	1.00	R	0.00			130	T	0.98	S	0.02	A	0.00	213	Q	0.90	E	0.10									
48	W	1.00					131	Q	0.53	H	0.28	Y	0.17	214	S	1.00	N	0.00									
49	A	1.00					132	E	1.00	D	0.01			215	Q	0.82	K	0.17	R	0.01							
50	K	1.00					133	E	1.00					216	A	0.95	T	0.03	S	0.01							
51	A	0.88	V	0.08	S	0.04	134	F	0.99	Y	0.01			217	L	1.00	M	0.00									
52	L	1.00	M	0.00			135	L	1.00					218	S	0.96	K	0.01	N	0.01							
53	P	1.00					136	C	1.00					219	V	1.00											
54	G	1.00					137	M	1.00					220	E	1.00											
55	F	1.00					138	K	1.00					221	F	1.00											
56	R	1.00	K	0.00			139	A	0.87	V	0.13			222	P	1.00											
57	N	0.99	S	0.01	D	0.00	140	L	0.98	I	0.02	M	0.00	223	E	1.00	D	0.00									
58	L	1.00					141	L	1.00					224	M	1.00											
59	H	0.98	P	0.01	Q	0.01	142	L	1.00					225	L	0.77	M	0.23	I	0.00							
60	L	0.79	I	0.21	M	0.00	143	L	1.00					226	V	0.63	S	0.18	A	0.14							
61	D	0.99	E	0.01	N	0.00	144	S	0.99	N	0.01	G	0.00	227	E	1.00											
62	D	1.00					145	T	1.00					228	I	1.00	M	0.00									
63	Q	1.00					146	V	0.67	I	0.33			229	I	1.00											
64	M	1.00					147	P	1.00					230	S	1.00	N	0.00	T	0.00							
65	T	1.00					148	K	0.61	Q	0.34	R	0.04	231	A	0.90	D	0.07	N	0.03							
66	L	1.00					149	E	0.54	D	0.46	N	0.00	232	Q	1.00											
67	I	0.52	L	0.48	M	0.00	150	G	1.00					233	L	1.00	M	0.00	F	0.00							
68	Q	1.00					151	L	1.00					234	P	1.00											
69	Y	1.00					152	K	1.00	R	0.00			235	K	0.95	R	0.05	Q	0.00							
70	S	1.00					153	S	1.00	T	0.00	N	0.00	236	V	0.86	I	0.14	M	0.00							
71	W	1.00					154	Q	1.00	H	0.00			237	L	0.49	M	0.22	T	0.14							
72	M	1.00					155	A	0.83	T	0.13	S	0.04	238	A	0.92	S	0.05	T	0.03							
73	G	0.75	S	0.14	C	0.10	156	S	0.34	Y	0.17	A	0.15	239	G	1.00											
74	L	1.00					157	F	1.00					240	M	0.97	L	0.01	I	0.01							
75	M	1.00					158	D	0.95	E	0.05	N	0.00	241	A	0.96	T	0.03	V	0.00							
76	A	0.88	S	0.05	T	0.03	159	E	1.00	D	0.00	Q	0.00	242	K	1.00	R	0.00									
77	F	1.00					160	M	0.99	I	0.01	L	0.00	243	P	1.00	S	0.00									
78	A	0.84	S	0.15	G	0.00	161	R	1.00					244	L	1.00											
79	L	0.59	M	0.41	I	0.00	162	M	1.00	I	0.00	L	0.00	245	L	0.99	F	0.00	M	0.00							
80	Q	0.92	S	0.07	A	0.02	163	N	0.98	S	0.02	D	0.00	246	F	1.00											
81	W	1.00					164	Y	1.00					247	H	1.00											
82	R	1.00					165	I	1.00					248	K	0.91	R	0.07	Q	0.02							
83	S	1.00					166	K	0.68	R	0.32	Q	0.00	249	K	1.00	R	0.00									

Mean

Posterior Probability

0.93