

Table S1. Primers used for PCR amplification of tc0237, tc0412, and tc0668 genes

Primer Name	Primer Sequence (5'→3')
TC023X_For-115	CACTTAAAAGAAAAGGGGTAAATAATA
TC023X_For+479	AACCCCCTAGACTAATTTGAGG
TC023X_Rev+1655	TGTTTACAATGGGCCCTATTATCTAGG
TC0412_For-75	ATGAACCGGAGTGGATGG
TC0412_Rev+1179	TCCATAACTTCAAAAAGAGGCACAC
TC0668_For-89	CTCGTTAAAACCTTATCCTTTCCTCTCC
TC0668_For+410	AGCGTTCCTTTTGACAAAAGTAT
TC0668_Rev+1310	ATGAAACGCGAAGGAGTCAAAT

Table S1. Primers used for PCR amplification of tc0237, tc0412, and tc0668 genes. Primers are named by their target gene, forward/reverse in relation to the ORF strand, and forward ORF position from the first base of the start codon.

Table S2. Accessions of sequencing data deposited to public databases

Species	Strain	Population/ Clone	BioProject Accession	BioSample Accession	SRA Experiment	SRA Sample	SRA Run	GenBank Accession	Locus Tag Prefix	TaxID
<i>Chlamydia muridarum</i>	Nigg3	G0	PRJNA227769	SAMN02402710	SRX665165	SRS669997	SRR1531377	CP009760.1	DNC	1434769
<i>Chlamydia muridarum</i>	Nigg3	G13.11.1	PRJNA227769	SAMN03569055	SRX1011105	SRS923052	SRR1999066			83560
<i>Chlamydia muridarum</i>	Nigg3	G13.32.1	PRJNA227769	SAMN03569056	SRX1011110	SRS923053	SRR1999067			83560
<i>Chlamydia muridarum</i>	Nigg3	G28	PRJNA227769	SAMN02630906	SRX665182	SRS670002	SRR1531380			83560
<i>Chlamydia muridarum</i>	Nigg3	G28.51.1	PRJNA227769	SAMN03273902	SRX825529	SRS805055	SRR1736645			83560
<i>Chlamydia muridarum</i>	Nigg3	G40	PRJNA227769	SAMN03273906	SRX825533	SRS805058	SRR1736650			83560
<i>Chlamydia muridarum</i>	Nigg3	G40.50.2	PRJNA227769	SAMN03569058	SRX1011113	SRS923056	SRR1999069			83560

Table S2. Accessions of sequencing data deposited to public databases. 977 Unmapped passage population and clone whole-genome NGS reads were 978 uploaded to the Sequence Read Archive (SRA) under the indicated experiment, 45 979 sample, and run accessions. The representative chromosome for the Nigg3 980 parent and its annotation are available from GenBank.

Table S3. *C. muridarum* Nigg3 plaque clone genotypes

Nigg3 Passage	Clone	TC0412	TC0668	TC0237
G0	1	E1	WT	WT
G0	2	G1	WT	WT
G0	3	G1	WT	WT
G0	4	G1	WT	WT
G0	5	E1	WT	WT
G0	6	B1	WT	WT
G0	7	C1	WT	WT
G0	8	C1	WT	WT
G0	9.1	D2	WT	WT
G0	10	B3	WT	WT
G0	11	C1	WT	WT
G0	12.1	C1	WT	WT
G0	13	B3	WT	WT
G0	14	C1	WT	WT
G0	15.1	C2	WT	WT
G0	16	B2	WT	WT
G0	17	E1	WT	WT
G0	18	B1	WT	WT
G0	19.1	B1	WT	WT
G0	20	C2	WT	WT
G0	21.3	D1	WT	WT
G0	22	D1	WT	WT
G0	23	C2	WT	WT
G0	24	E1	WT	WT
G0	25	F1	WT	WT
G0	26	C1	WT	WT
G0	27	C2	WT	WT
G0	28	B3	WT	WT
G0	29	D2	WT	WT

G0	30	B3	WT	WT
G0	31	B3	WT	WT
G0	32	C2	WT	WT
G0	33	E1	WT	WT
G0	34	C2	WT	WT
G0	35	C2	WT	WT
G0	36	F1	WT	WT
G0	37	D1	WT	WT
G0	38	B1	WT	WT
G0	39	E1	WT	WT
G0	40	B1	WT	WT
G0	41	B1	WT	WT
G0	42	B3	WT	WT
G0	43	B3	WT	WT
G0	44	F1	WT	WT
G0	45	B2	WT	WT
G0	46	C2	WT	WT
G0	47	B1	WT	WT
G0	48	C2	WT	WT
G0	49	B3	WT	WT
G0	50	B3	WT	WT
G13	1	D1	G322R	WT
G13	2	D1	G322R	WT
G13	3	D1	WT	WT
G13	4	B3	WT	WT
G13	5	D1	G322R	WT
G13	6	D1	G322R	WT
G13	7	D1	G322R	WT
G13	8	nd	WT	WT
G13	9	D1	G322R	WT
G13	10	D1	G322R	WT
G13	11	B2	G216*	WT
G13	12	D1	G322R	WT
G13	13	B2	G216*	WT
G13	14	D1	G322R	WT
G13	15	D2	WT	WT
G13	16	B2	G216*	WT
G13	17	B3	WT	WT
G13	18	D1	G322R	WT
G13	19	B2	G216*	WT
G13	20	D1	G322R	WT
G13	21	D1	G322R	WT
G13	22	B2	nd	WT
G13	23	B2	G216*	WT
G13	24	D1	G322R	WT
G13	25	nd	nd	nd
G13	26	nd	nd	nd
G13	27	D1	G322R	WT
G13	28	B2	G216*	WT
G13	29	C2	WT	WT
G13	30	D1	G322R	WT

G13	31	D1	G322R	WT
G13	32	B2	WT	WT
G13	33	B2	G216*	WT
G13	34	B3	WT	WT
G13	35	D1	G322R	WT
G13	36	D1	G322R	WT
G13	37	B2	G216*	WT
G13	38	D1	G322R	WT
G13	39	B3	WT	WT
G13	40	B2	G216*	WT
G13	41	D1	G322R	WT
G13	42	B2	G216*	WT
G13	43	D1	G322R	WT
G13	44	D1	G322R	WT
G13	45	B3	WT	WT
G13	46	D1	G322R	WT
G13	47	B3	WT	WT
G13	48	B2	G216*	WT
G13	49	B4	WT	WT
G13	50	D1	G322R	WT
G13	51	B2	G216*	WT
G13	52	C2	WT	WT
G13	53	B2	G216*	WT
G13	54	D1	G322R	WT
G13	55	D1	G322R	WT
G13	56	D1	G322R	WT
G13	57	B2	G322R	WT
G13	58	B2	G216*	WT
G13	59	B3	G322R	WT
G13	60	D1	G322R	WT
G13	61	C2	WT	WT
G13	62	D1	G322R	WT
G13	63	B2	G216*	WT
G13	64	D1	G322R	WT
G13	65	D1	G322R	WT
G13	66	B2	G216*	WT
G13	67	D1	G322R	WT
G13	68	C2	WT	WT
G13	69	D1	G322R	WT
G13	70	B2	G216*	WT
G13	71	C2	G216*	WT
G13	72	B2	G216*	WT
G13	73	B2	G216*	WT
G13	74	D1	G322R	WT
G13	75	D1	G322R	WT
G13	76	C2	nd	WT
G13	77	D1	G322R	WT
G13	78	D1	G322R	WT
G13	79	nd	G322R	WT
G13	80	B3	WT	Q117E
G13	81	D1	G322R	WT

G13	82	E1	G216*	WT
G13	83	B2	G216*	WT
G13	84	D1	G322R	WT
G13	85	B2	G216*	WT
G13	86	D1	nd	WT
G13	87	B2	G216*	WT
G13	88	D1	G322R	WT
G13	89	D1	G322R	WT
G13	90	B2	G216*	WT
G13	91	D1	G322R	WT
G13	92	D1	G322R	WT
G13	93	D1	G322R	WT
G13	94	B2	G216*	WT
G13	95	D1	G322R	WT
G13	96	B2	G216*	WT
G16	1	B3	WT	Q117E
G16	2	B3	WT	Q117E
G16	3	B3	WT	Q117E
G16	4	B3	WT	Q117E
G16	5	B2	G216*	WT
G16	6	B3	WT	Q117E
G16	7	B3	WT	Q117E
G16	8	B3	WT	Q117E
G16	9	B3	WT	Q117E
G16	10	B3	WT	Q117E
G16	11	B3	WT	Q117E
G16	12	C1	WT	Q117E
G16	13	B3	WT	Q117E
G16	14	B3	WT	Q117E
G16	15	B3	WT	Q117E
G16	16	B3	WT	Q117E
G16	17	B3	WT	Q117E
G16	18	B3	WT	Q117E
G16	19	B3	WT	Q117E
G16	20	B3	WT	Q117E
G16	21	B3	WT	Q117E
G16	22	B3	WT	Q117E
G16	23	B3	WT	Q117E
G16	24	B3	WT	Q117E
G16	25	E1	WT	Q117E
G16	26	B2	G216*	WT
G16	27	B3	WT	Q117E
G16	28	B3	WT	nd
G16	29	nd	G216*	nd
G16	30	B3	WT	Q117E
G16	31	D1	G322R	WT
G16	32	B3	WT	Q117E
G16	33	B3	WT	Q117E
G16	34	E1	WT	Q117E
G16	35	B3	WT	Q117E
G16	36	B3	WT	Q117E

G16	37	B3	WT	Q117E
G16	38	D1	G322R	WT
G16	39	B3	WT	Q117E
G16	40	nd	WT	Q117E
G16	41	B3	WT	Q117E
G16	42	B3	WT	Q117E
G16	43	D1	G322R	WT
G16	44	B3	WT	Q117E
G16	45	nd	WT	Q117E
G16	46	B3	WT	Q117E
G16	47	B3	WT	Q117E
G16	48	B3	WT	Q117E
G16	49	B3	WT	Q117E
G16	50	D1	G322R	WT
G16	51	B3	G216*	WT
G16	52	B3	WT	Q117E
G16	53	B3	WT	nd
G16	54	D1	G322R	WT
G16	55	B3	WT	Q117E
G16	56	B3	WT	Q117E
G16	57	B3	WT	Q117E
G16	58	B3	WT	Q117E
G16	59	D1	G322R	WT
G16	60	B2	G216*	WT
G16	61	B3	WT	Q117E
G16	62	B3	WT	Q117E
G16	63	D1	G322R	WT
G16	64	B3	WT	Q117E
G16	65	B3	WT	Q117E
G16	66	B3	WT	Q117E
G16	67	B3	WT	Q117E
G16	68	B3	WT	Q117E
G16	69	B3	WT	Q117E
G16	70	nd	WT	Q117E
G16	71	B3	WT	Q117E
G16	72	B3	WT	Q117E
G16	73	B3	WT	Q117E
G16	74	D1	G322R	WT
G16	75	B3	WT	Q117E
G16	76	nd	WT	Q117E
G16	77	B3	WT	Q117E
G16	78	D1	G322R	WT
G16	79	B3	WT	Q117E
G16	80	B3	WT	Q117E
G16	81	B3	WT	Q117E
G16	82	B3	WT	nd
G16	83	D1	G322R	WT
G16	84	D1	G322R	WT
G16	85	B3	WT	Q117E
G16	86	B3	WT	Q117E
G16	87	B3	WT	Q117E

G16	88	B3	WT	Q117E
G16	89	B3	WT	Q117E
G16	90	B3	WT	Q117E
G16	91	B3	WT	Q117E
G16	92	B3	WT	Q117E
G16	93	B3	WT	nd
G16	94	B3	WT	nd
G16	95	nd	WT	nd
G16	96	nd	WT	nd
G28	1.2	D1	G322R	Q117E
G28	2	B2	WT	Q117E
G28	3	B3	WT	Q117E
G28	4	D1	G322R	Q117E
G28	5	B3	WT	Q117E
G28	6	B3	WT	Q117E
G28	7	B3	WT	Q117E
G28	8	D1	G322R	Q117E
G28	9	E1	WT	Q117E
G28	10.2	B3	WT	Q117E
G28	11	B3	WT	Q117E
G28	12.3	D1	G322R	Q117E
G28	13.2	B3	WT	Q117E
G28	14	D1	G322R	Q117E
G28	15.1	D1	G322R	Q117E
G28	16.1	E1	WT	Q117E
G28	17.1	D1	G322R	Q117E
G28	18.1	C1	WT	Q117E
G28	19.1	B3	WT	Q117E
G28	20.1	B3	WT	Q117E
G28	21.1	B3	WT	Q117E
G28	22.1	B3	WT	Q117E
G28	23.1	B3	WT	Q117E
G28	24	nd	nd	nd
G28	25	D1	G322R	Q117E
G28	26	nd	nd	nd
G28	27	nd	nd	nd
G28	28	nd	nd	nd
G28	29	nd	nd	nd
G28	30	B3	WT	Q117E
G28	31.1	E1	WT	Q117E
G28	32	nd	nd	nd
G28	33.1	D1	G322R	Q117E
G28	34.1	B3	WT	Q117E
G28	35.1	E1	WT	Q117E
G28	36	nd	nd	nd
G28	37	nd	nd	nd
G28	38	E1	WT	Q117E
G28	39	B2	G322R	Q117E
G28	40	C1	WT	Q117E
G28	41	D1	G322R	Q117E
G28	42	B3	WT	Q117E

G28	43	E1	WT	Q117E
G28	44	D1	G322R	Q117E
G28	45	B3	WT	Q117E
G28	46	D1	G322R	Q117E
G28	47	nd	nd	nd
G28	48	B3	G322R	Q117E
G28	49	B3	WT	Q117E
G28	50	nd	nd	nd
G28	51	B2	G216*	Q117E
G28	52	D1	G322R	Q117E
G28	53	B3	WT	Q117E
G28	54	B3	G322R	Q117E
G28	55	D1	G322R	Q117E
G28	56	B3	WT	Q117E
G28	57	B3	G322R	Q117E
G28	58	B3	WT	Q117E
G28	59	B3	G322R	Q117E
G28	60	B3	WT	Q117E
G28	61	nd	nd	nd
G28	62	B3	WT	Q117E
G28	63	D1	G322R	Q117E
G28	64	D1	G322R	Q117E
G28	65	B3	WT	Q117E
G28	66	E1	WT	Q117E
G28	67	D1	G322R	Q117E
G40	1	nd	nd	nd
G40	2	E1	WT	Q117E
G40	3	E1	WT	Q117E
G40	4	B2	G216*	Q117E
G40	5	E1	WT	Q117E
G40	6	D1	G322R	Q117E
G40	7	E1	WT	Q117E
G40	8	E1	WT	Q117E
G40	9	D1	G322R	Q117E
G40	10	E1	WT	Q117E
G40	11	D1	G322R	Q117E
G40	12	B3	WT	Q117E
G40	13	D1	G322R	Q117E
G40	14	E1	WT	Q117E
G40	15	D1	G322R	Q117E
G40	16	D1	G322R	Q117E
G40	17	B3	G322R	Q117E
G40	18	E1	WT	Q117E
G40	19	D1	WT	Q117E
G40	20	E1	WT	Q117E
G40	21	C1	WT	Q117E
G40	22	D1	WT	Q117E
G40	23	nd	nd	nd
G40	24	D1	G322R	Q117E
G40	25	D1	G322R	Q117E
G40	26	E1	WT	Q117E

G40	27	D1	G322R	Q117E
G40	28	B2	G216*	Q117E
G40	29	B2	G216*	Q117E
G40	30	E1	WT	Q117E
G40	31	B3	G216*	Q117E
G40	32	B3	G322R	Q117E
G40	33	D1	G322R	Q117E
G40	34	E1	WT	Q117E
G40	35	D1	G322R	Q117E
G40	36	nd	nd	nd
G40	37	D1	G322R	Q117E
G40	38	E1	WT	Q117E
G40	39	E1	WT	Q117E
G40	40	E1	WT	Q117E
G40	41	E1	WT	Q117E
G40	42	E1	WT	Q117E
G40	43	D1	G322R	Q117E
G40	44	D1	G322R	Q117E
G40	45	D1	G322R	Q117E
G40	46	D1	G322R	Q117E
G40	47	E1	G322R	Q117E
G40	48	B2	G216*	Q117E
G40	49	E1	WT	Q117E
G40	50	B2	WT	Q117E
G40	51	C1	WT	Q117E
G40	52	D1	G322R	Q117E
G40	53	C1	WT	Q117E

Table S3. *C. muridarum* Nigg3 plaque clone genotypes. Genotypes were determined by Sanger sequencing of tc0412, tc0668, and tc0237 PCR amplicons. tc0412 genotypes are expressed as proteoforms (Table 2), while tc0668 and tc0237 genotypes are expressed as protein variants. Sanger sequence reads with inadequate quality to make a genotype call are noted by “nd” for “no data.”