

## **Supplementary Material**

**The macroparasite fauna of cichlid fish from Nicaraguan lakes, a model system for understanding host-parasite diversification and speciation**

Ana Santacruz, Marta Barluenga and Gerardo Pérez-Ponce de León

**Supplementary Table S1.** GenBank accession numbers and CNHE or CNCR catalog numbers.

Parasite	cox1	cox2	28S	18S	ITS	CNHE	CNCR
<b>Trematoda</b>							
<i>Ascocotyle pindoramensis</i>	-	-	OL960048-50	-	-	-	-
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	-	-	-	-	-	11496	-
<i>Crassicutis cichlasomae</i>	OM514320-23	-	-	-	OL872180	11483-11486	-
<i>Ithyoclinostomum yamagutii</i>	-	-	-	-	-	11498	-
Heterophyidae gen. sp.	-	-	-	-	-	11504	-
<i>Oligogonotylus manteri</i>	OM514349-52	-	OL960047	-	-	11487-11490	-
<i>Phostodiplostomum</i> sp. 1	-	-	-	-	-	11500	-
<i>Phostodiplostomum</i> sp. 2	-	-	-	-	-	11501	-
<i>Saccocoelioides orosiensis</i>	OM540397-99	-	-	-	-	-	-
<i>Saccocoelioides</i> cf. <i>lamothei</i>	OM540400-01	-	-	-	-	-	-
<b>Monogenea</b>							
<i>Sciadicleithrum mexicanum</i>	OM540389-94	-	OL960045	-	-	11475-11480	-
<i>Sciadicleithrum nicaraguensis</i>	-	-	OL960043-44	-	-	11481	-
<i>Sciadicleithrum</i> sp. 1	OM540395	-	OL960046	-	-	-	-
<b>Acanthocephala</b>							
<i>Neoechinorynchus costarricense</i>	OM540396	-	OL960051	-	-	11507	-
<b>Nematoda</b>							
<i>Contraeaecum</i> sp. 1	-	OM524389	-	-	-	-	-
<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	-	-	-	-	11506	-
<i>Physocephalus</i> sp.	-	-	-	-	-	11505	-
<i>Procamallanus barlowi</i>	MW487882-87	-	MW485591-93	-	-	11472-11473	-
<b>Copepoda</b>							
<i>Acusicola margulisae</i>	MN854838-70	-	MN852849-51	MN852694-96	-	-	35553-35553
Ergasilidae gen. sp.	OM541914	-	-	-	-	-	-
Lernaeidae gen. sp.	OM541913	-	-	-	-	-	-

**Supplementary Table S2.** Primers used for PCR and sequencing of parasites in this study.

Genetic region	Primer name	F/ R	Sequence (5'- 3')	Reference
cox1	JB3/ Asmit1	F	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	1
	JB4.5	R	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG	1
	Schisto3	R	TAATGCATMGGAAAAAACA	2
	507	F	AGTTCTAATCATAARGATATYGG	3
	HCO2198	R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	4
	pr-b	R	AGTTCTAATCATAARGATATYGG	5
	MplatCOX1dF	F	TGTAAAACGACGGCCAGTTTWCITTRGATCATAAG	6
	MplatCOX1dR	R	CAGGAAACAGCTATGACTGAAAYAAIIGGATCICCACC	6
	cox2	210	F	TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT
211		R	CACCAACTCTTAAAATTATC	7
28S	391	F	AGCGGAGGAAAAGAACTAA	8
	536	R	CAGCTATCCTGAGGGAAAC	9
	502*	F	CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC	9
	28SF	F	ACAACGTGATGCCCTTAG	10
	28SR	R	TGGTCCGTGTTCAAGACG	10
	U178	F	GCACCCGCTGAAYTTAAG	2
	1200R*	R	GCATAGTTCACCATCTTTCGG	2
	L1642	R	CCAGCGCCATCCATTTTCA	2
	18S	18SF	F	AAGGTGTGMCCTATCAACT
18SR		R	TTACTTCCTCTAAACGCTC	10

F: forward primer; R: reverse primer

Asterisk indicates primers used only in sequencing reaction.

## REFERENCES

1. Bowles, J., Blair, D. & McManus, D. P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**, 165–173 (1992).
2. Lockyer, A. E., Olson, P. D. & Littlewood, D. T. J. Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): Implications and a review of the cercomer theory. *Biol. J. Linn. Soc.* **78**, 155–171 (2003).
3. Nadler, S. A., Bolotin, E. & Stock, S. P. Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Syst. Parasitol.* **63**, 161–181 (2006).
4. Black, M. *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**, 294–299 (1994).
5. Bessho, Y., Ohama, T. & Osawa, S. Planarian mitochondria I. Heterogeneity of cytochrome c oxidase subunit I gene sequences in the freshwater planarian, *Dugesia japonica*. *J. Mol. Evol.* **34**, 324–330 (1992).
6. Moszczyńska, A., Locke, S. A., McLaughlin, J. D., Marcogliese, D. J. & Crease, T. J. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase i gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. *Mol. Ecol. Resour.* **9**, 75–82 (2009).
7. Nadler, S. A. & Hudspeth, D. S. S. Phylogeny of the ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: Hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.* **86**, 380–393 (2000).
8. Nadler, S. A. & Hudspeth, D. S. S. Ribosomal DNA and Phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): Implications for Morphological Evolution and Classification. *Mol. Phylogenet. Evol.* **10**, 221–236 (1998).
9. García-Varela, M. & Nadler, S. A. Phylogenetic relationships of palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *J. Parasitol.* **91**, 1401–1409 (2005).
10. Song, Y., Wang, G. T., Yao, W. J., Gao, Q. & Nie, P. Phylogeny of freshwater parasitic copepods in the Ergasilidae (Copepoda: Poecilostomatoida) based on 18S and 28S rDNA sequences. *Parasitol. Res.* **102**, 299–306 (2008).

**Supplementary Table S3.** Species of cichlids sampled in two great and five crater lakes of Nicaragua between 2017 and 2019, indicating overall prevalence of macroparasites per sampling year. Ne. Number of fish examined, Ni. Number of fish infected, P. prevalence (%).

Lake	Host species	Host code	Year									Total
			2017			2018			2019			
			Ne	Ni	P	Ne	Ni	P	Ne	Ni	P	
Asososca León (108)	<b><i>Amphilophus citrinellus</i></b>	AciAsL	20	20	100	28	28	100	23	23	100	71
	<i>Oreochromis</i> sp.	OreAsL	3	3	100	3	3	100	8	3		14
	<i>Parachromis</i> spp.	ParAsL	5	5	100	12	12	100	6	6	100	23
Apoyeque (26)	<b><i>Amphilophus citrinellus</i></b>	AciAye	22	22	100	-	-	-	-	-	-	22
	<i>Parachromis</i> spp.	ParAye	4	4	100	-	-	-	-	-	-	4
Apoyo (117)	<b><i>Amphilophus astorquii</i></b>	AasApo	16	16	100	4	4	100	7	7	100	27
	<b><i>Amphilophus chanco</i></b>	AchApo	15	15	100	5	5	100	13	13	100	33
	<b><i>Amphilophus flavealus</i></b>	AflApo	1	1	100	-	-	-	-	-	-	1
	<b><i>Amphilophus zaliosus</i></b>	AzaApo	14	14	100	5	5	100	14	14	100	33
	<b><i>Amphilophus globosus</i></b>	AglApo	-	-	-	-	-	-	3	3	100	3
	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	NigApo	-	-	-	11	10	90.9	6	5		17
	<i>Parachromis</i> spp.	ParApo	-	-	-	3	3	100	-	-		3
Masaya (39)	<b><i>Amphilophus citrinellus</i></b>	AciMas	25	25	100	10	10	100	-	-	-	35
	<i>Cribroheros longimanus</i>	LonMas	3	3	100	-	-	-	-	-	-	3
	<i>Hypsophrys nematopus</i>	NeeMas	-	-	-	1	1	100	-	-	-	1
Xiloá (145)	<b><i>Amphilophus amarillo</i></b>	AmaXil	16	16	100	5	3	60	1	1	100	22
	<b><i>Amphilophus sagittae</i></b>	AsaXil	16	16	100	27	27	100	6	6	100	49
	<b><i>Amphilophus xiloaensis</i></b>	AxiXil	11	11	100	4	4	100	7	7	100	22
	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	NigXil	-	-	-	5	3		4	4	100	9
	<i>Cribroheros longimanus</i>	LonAxil	-	-	-	2	2	100	3			5
	<i>Cribroheros rostratus</i>	RosXil	-	-	-	3	3	100	4	4	100	7
	<i>Hypsophrys nematopus</i>	NeeXil	-	-	-	4	2	50	3	2		7
	<i>Hypsophrys nicaraguensis</i>	HypXil	-	-	-	7	7	100	6			13
	<i>Parachromis</i> spp.	ParXil	5	5	100	5	5	100	1	1	100	11
Managua (152)	<b><i>Amphilophus citrinellus</i></b>	AciMan	30	29	96.6	30	30	100	26	26	100	86
	<b><i>Amphilophus labiatus</i></b>	AlaMan	9	9	100	7	7	100	5	5	100	21
	<i>Cribroheros rostratus</i>	RosMan	1	1	100	3	3	100	6	5		10
	<i>Hypsophrys nematopus</i>	NeeMan	-	-	-	-	-	-	8		100	8
	<i>Oreochromis</i> sp.	OreMan	-	-	-	6	0	0	11	7		17
	<i>Parachromis</i> spp.	ParMan	3	3	100	4	4	100	3	3	100	10
Nicaragua (167)	<b><i>Amphilophus citrinellus</i></b>	AciNic	9	9	100	21	21	100	15	15	100	45
	<b><i>Amphilophus labiatus</i></b>	AlaNic	14	14	100	13	13	100	12	12	100	39
	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	NigNic	-	-	-	-	-	-	3		100	3
	<i>Archocentrus centrarchus</i>	CenNic	-	-	-	-	-	-	8	7		8
	<i>Cribroheros longimanus</i>	LonNic	-	-	-	1	1	100	2	2	100	3
	<i>Cribroheros rostratus</i>	RosNic	-	-	-	8	8	100	3		100	11
	<i>Herotilapia multispinosa</i>	HmuNic	-	-	-	-	-	-	1	1	100	1
	<i>Hypsophrys nematopus</i>	NeeNic	-	-	-	13	13	100	1	1	100	14
	<i>Hypsophrys nicaraguensis</i>	HypNic	-	-	-	13	12		3	2		16
	<i>Parachromis</i> spp.	ParNic	3	3	100	6	6	100	14	14	100	23
	<i>Vieja</i> sp.	VieNic	1	0	0	3	3	100	-	-	-	4

**Supplementary Table 4.** Host-parasite records within lakes. In bold the Midas cichlids species are indicated.

Lake	Species	Host species
<b>Trematoda</b>		
Nicaragua	<i>Ascocotyle pindoramensis</i>	<b>A. labiatus</b>
	<i>Crassicutis cichlasomae</i>	<b>A. citrinellus, A. labiatus</b> , <i>A. centrarchus</i> , <i>A. nigrofasciata</i> , <i>C. rostratus</i> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>H. nematopus</i> , <i>Parachromis</i> spp., <i>Vieja</i> sp.
	<i>Ithyoclinostomum yamagutii</i>	<i>H. nicaraguensis</i> , <i>H. nematopus</i> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Oligogonotylus manteri</i>	<b>A. citrinellus, A. labiatus</b> , <i>C. rostratus</i> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>H. nematopus</i> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 1	<i>H. nematopus</i>
	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 2	<i>A. nigrofasciata</i>
	<i>Saccocoleioides</i> cf. <i>lamothei</i>	<i>H. nematopus</i>
	<i>Saccocoleioides</i> spp.	<i>H. nematopus</i>
	Strigeidae gen sp.	<i>H. nematopus</i>
Managua	<i>Ascocotyle pindoramensis</i>	<i>Parachromis</i> sp.
	<i>Austrodiplostomum compactum</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>C. rostratus</i> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Crassicutis cichlasomae</i>	<b>A. citrinellus, A. labiatus</b> , <i>C. rostratus</i> , <i>Parachromis</i> spp.
	Cryptogonimidae gen. sp.	<i>Parachromis</i> spp.
	Heterophyidae gen. sp.	<i>Oreochromis</i> sp.
	<i>Oligogonotylus manteri</i>	<b>A. citrinellus, A. labiatus</b> , <i>C. rostratus</i> , <i>H. nematopus</i> , <i>Parachromis</i> spp.
Asososca León	<i>Saccocoleioides</i> spp.	<b>A. citrinellus</b> , <i>Oreochromis</i> sp., <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Crassicutis cichlasomae</i>	<b>A. citrinellus</b>
	<i>Oligogonotylus manteri</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Saccocoleioides</i> cf. <i>lamothei</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>Oreochromis</i> sp.
	<i>Saccocoleioides orosiensis</i>	<i>Oreochromis</i> sp.
Apoyeque	<i>Saccocoleioides</i> spp.	<b>A. citrinellus</b> , <i>Oreochromis</i> sp.
	<i>Crassicutis cichlasomae</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Oligogonotylus manteri</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
Xiloá	<i>Crassicutis cichlasomae</i>	<b>A. amarillo, A. sagittae, A. xiloaensis</b> , <i>C. longimanus</i> , <i>A. nigrofasciata</i> , <i>C. rostratus</i> , <i>H. nicaraguensis</i>
	<i>Oligogonotylus manteri</i>	<b>A. amarillo, A. sagittae, A. xiloaensis</b> , <i>C. longimanus</i> , <i>C. rostratus</i> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>H. nematopus</i> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Saccocoleioides orosiensis</i>	<b>A. sagittae, A. xiloaensis</b> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>H. nematopus</i>
	<i>Saccocoleioides</i> spp.	<b>A. sagittae</b>
Masaya	<i>Crassicutis cichlasomae</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>C. longimanus</i>
	<i>Oligogonotylus manteri</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>H. nematopus</i>
	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 1	<i>H. nematopus</i>
Apoyo	<i>Crassicutis cichlasomae</i>	<b>A. astorquii, A. chancho, A. globosus, A. flaveolus, A. zaliosus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Oligogonotylus manteri</i>	<b>A. astorquii, A. chancho, A. globosus, A. zaliosus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Saccocoleioides orosiensis</i>	<b>A. astorquii, A. chancho, A. zaliosus</b> , <i>A. nigrofasciata</i>
	<i>Saccocoleioides</i> spp.	<b>A. astorquii, A. chancho, A. flaveolus, A. globosus, A. zaliosus</b>

**Cestoda**

Nicaragua	<i>Cichlidocestus janikae</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>H. nicaraguensis</i>
Managua	<i>Schyzocotyle acheilognathi</i>	<b>A. citrinellus</b>
Xiloá	<i>Schyzocotyle acheilognathi</i>	<i>Parachromis</i> spp.

**Monogenea**

Nicaragua	<i>Sciadicleithrum mexicanum</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Sciadicleithrum</i> sp. 2	<i>C. rostratus</i>
Managua	<i>Sciadicleithrum mexicanum</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
Asososca León	<i>Cichlidogyrus sclerosus</i>	<i>Oreochromis</i> sp.
	<i>Sciadicleithrum mexicanum</i>	<i>Parachromis</i> spp.
Apoyeque	<i>Sciadicleithrum mexicanum</i>	<i>Parachromis</i> spp.
Xiloá	<i>Sciadicleithrum mexicanum</i>	<b>A. amarillo</b> , <b>A. sagittae</b> , <b>A. xiloaensis</b>
	<i>Sciadicleithrum</i> sp. 1	<i>A. nigrofasciata</i>
Masaya	<i>Sciadicleithrum mexicanum</i>	<b>A. citrinellus</b>
	<i>Sciadicleithrum nicaraguensis</i>	<i>C. longimanus</i>
Apoyo	<i>Sciadicleithrum mexicanum</i>	<b>A. astorquii</b> , <b>A. flaveolus</b> , <b>A. chancho</b> , <b>A. zaliosus</b> , <i>Parachromis</i> spp.

**Acantocephala**

Nicaragua	<i>Polymorphus brevis</i>	<b>A. citrinellus</b> , <b>A. labiatus</b> , <i>H. nematopus</i> , <i>Parachromis</i> spp., <i>Vieja</i> sp.
	<i>Neoechinorynchus costarricense</i>	<b>A. labiatus</b> , <i>A. nigrofasciata</i> , <i>H. nematopus</i> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>H. multispinosa</i> , <i>Parachromis</i> spp.
Managua	<i>Neoechinorynchus costarricense</i>	<b>A. citrinellus</b>
Asososca León	<i>Neoechinorynchus costarricense</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp., <i>Oreochromis</i> sp.
Apoyeque	<i>Neoechinorynchus costarricense</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
Xiloá	<i>Neoechinorynchus costarricense</i>	<b>A. amarillo</b> , <b>A. xiloaensis</b> , <b>A. sagittae</b> , <i>A. nigrofasciata</i> , <i>C. longimanus</i> , <i>Parachromis</i> spp.
Masaya	<i>Neoechinorynchus costarricense</i>	<b>A. citrinellus</b>
Apoyo	<i>Neoechinorynchus costarricense</i>	<b>A. astorquii</b> , <b>A. chancho</b> , <b>A. zaliosus</b> , <i>A. nigrofasciata</i> , <i>Parachromis</i> spp.

**Nematoda**

Nicaragua	<i>Contracaecum</i> sp. 1	<b>A. citrinellus</b> , <b>A. labiatus</b> , <i>A. centrarchus</i> , <i>C. rostratus</i> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>H. nematopus</i> , <i>Parachromis</i> spp., <i>Vieja</i> sp.
	<i>Physocephalus</i> sp.	<b>A. labiatus</b>
	<i>Procamallanus barlowi</i>	<b>A. citrinellus</b> , <b>A. labiatus</b> , <i>C. longimanus</i> , <i>C. rostratus</i> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>H. nematopus</i>
	<i>Rhabdochona</i> sp.	<b>A. citrinellus</b>
Managua	<i>Contracaecum</i> sp. 1	<b>A. citrinellus</b> , <b>A. labiatus</b> , <i>C. rostratus</i> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Procamallanus barlowi</i>	<b>A. citrinellus</b> , <b>A. labiatus</b> , <i>Parachromis</i> spp.,
Asososca León	<i>Contracaecum</i> sp. 1	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Contracaecum</i> sp. 2	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Contracaecum</i> sp. 3	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Procamallanus barlowi</i>	<b>A. citrinellus</b>
Apoyeque	<i>Procamallanus barlowi</i>	<i>Parachromis</i> spp.
Xiloá	<i>Contracaecum</i> sp. 1	<b>A. amarillo</b> , <b>A. sagittae</b> , <b>A. xiloaensis</b> , <i>C. rostratus</i> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>H. nematopus</i> , <i>Parachromis</i> spp.
	<i>Goezia</i> sp.	<b>A. sagittae</b>

Masaya	<i>Hysterothylacium</i> sp. <i>Contraecaecum</i> sp. 1 <i>Procamallanus barlowi</i>	<i>Parachromis</i> spp. <b>A. citrinellus</b> , <i>C. longimanus</i> <b>A. citrinellus</b> , <i>C. longimanus</i>
Apoyo	<i>Contraecaecum</i> sp. 1 <i>Goezia</i> sp. <i>Procamallanus barlowi</i>	<b>A. astorquii</b> , <b>A. chancho</b> , <b>A. zaliosus</b> , <i>Parachromis</i> spp. <b>A. zaliosus</b> <b>A. astorquii</b> , <b>A. chancho</b> , <b>A. zaliosus</b> , <i>A. nigrofasciata</i> , <i>Parachromis</i> spp.
<b>Hirudinea</b>		
Nicaragua	<i>Myzobdella</i> sp.	<i>Parachromis</i> spp.
<b>Copepoda</b>		
Nicaragua	<i>Acusicola</i> sp. Ergasilidae gen. sp.	<b>A. citrinellus</b> , <b>A. labiatus</b> <b>A. citrinellus</b> , <b>A. labiatus</b> , <i>H. nematopus</i> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>Parachromis</i> spp., <i>Vieja</i> sp.
Managua	Ergasilidae gen. sp. <i>Lernaea cyprinacea</i> Lernaeidae gen. sp.	<b>A. citrinellus</b> , <b>A. labiatus</b> , <i>C. rostratus</i> , <i>Parachromis</i> spp. <i>H. nematopus</i> <b>A. citrinellus</b> , <b>A. labiatus</b>
Asososca León	<i>Acusicola margulisae</i>	<b>A. citrinellus</b> , <i>Parachromis</i> spp., <i>Oreochromis</i> sp.
Xiloá	Ergasilidae gen. sp.	<b>A. amarillo</b> , <b>A. sagittae</b> , <b>A. xiloensis</b> , <i>A. nigrofasciata</i> , <i>C. longimanus</i> , <i>H. nicaraguensis</i> , <i>Parachromis</i> spp.
Apoyo	Ergasilidae gen. sp.	<b>A. astorquii</b>
<b>Branchiura</b>		
Asososca León	<i>Argulus</i> sp.	<b>A. citrinellus</b>
Xiloá	<i>Argulus</i> sp.	<b>A. sagittae</b>
<b>Acariformes</b>		
Xiloá	Oribatide gen. sp.	<i>Parachromis</i> spp.

