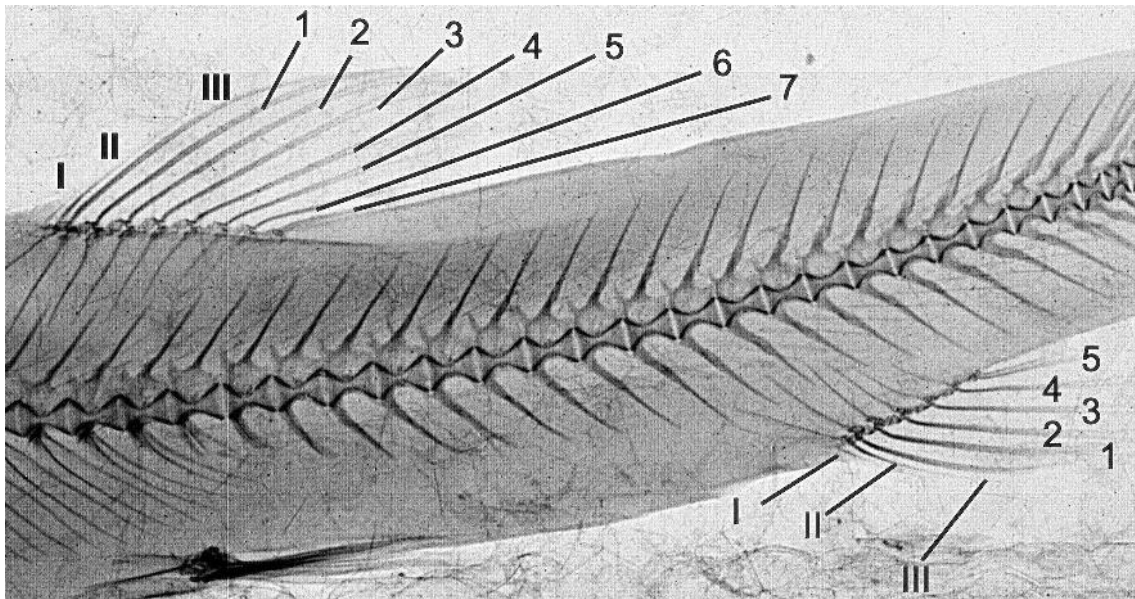
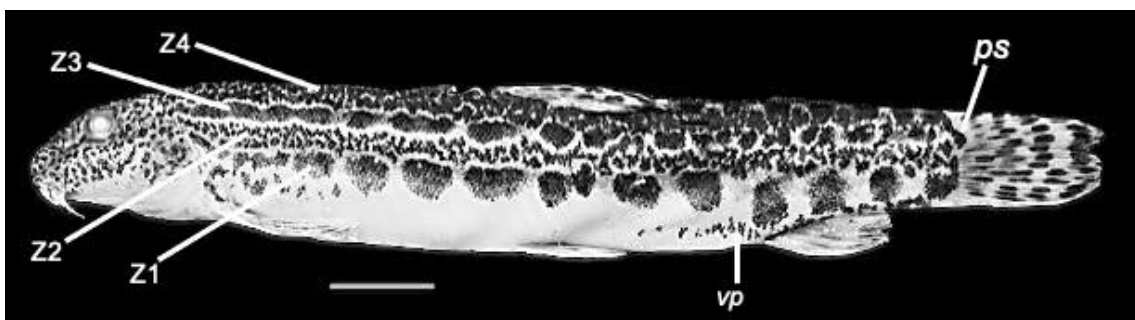


SUPPLEMENTARY INFORMATION

Appendix 1. Numeration of the dorsal and anal fin rays, in Roman single rays and in Arabic branched rays. 1. *Numeración de los radios de las aletas anal y dorsal, en números romanos los radios sencillos, en arábigos radios ramificados.*



Appendix 2. Numeration of the four pigmentary Gambetta zones followed in this study (Z1-Z4). *vp*: ventral pigmentation. *ps*: upper caudal peduncle spot. *Numeración de las 4 zonas de Gambetta seguidas en este estudio (Z1-Z4).* *vp* pigmentación ventral. *ps* mancha superior del pedúnculo caudal.

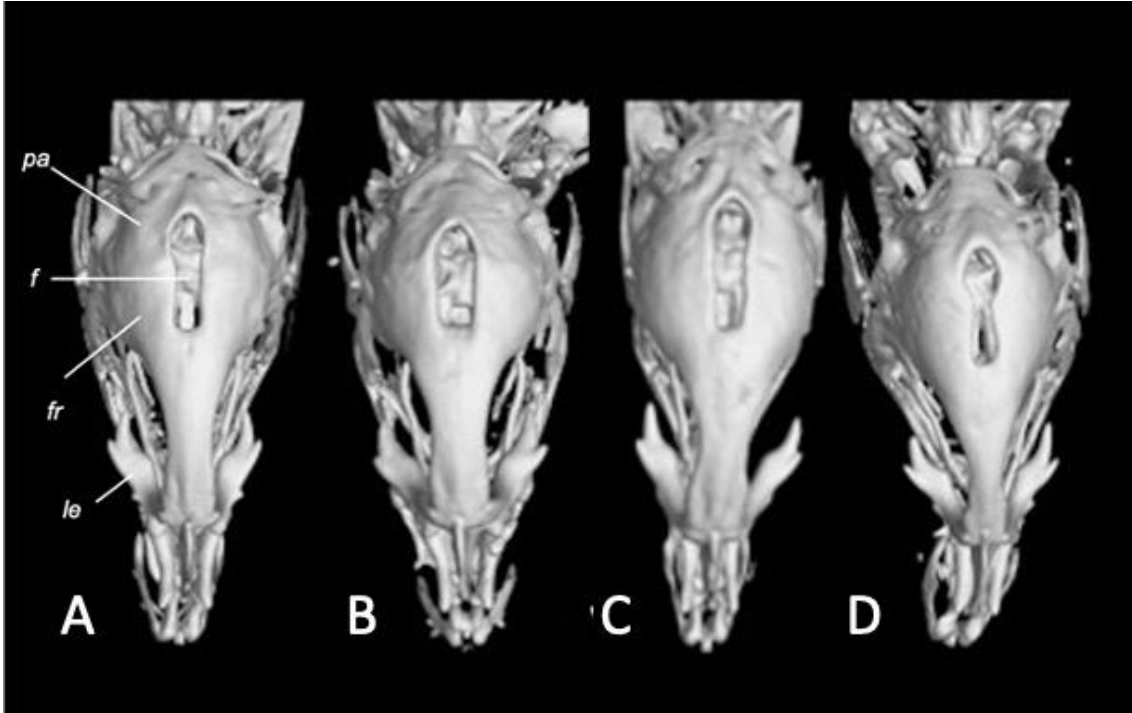


Appendix 3. Species and populations names, collection sites (river and drainage). GenBank accession numbers with an ¹ indicate new sequences obtained in this study. With * indicate populations used to network haplotypes. *Nombres de las especies y de las poblaciones, lugares de colecta (río y cuenca). Números de acceso al GenBank con un ¹ se indican las nuevas secuencias obtenidas en este estudio. Con un * se indican las poblaciones que fueron utilizados para establecer las redes de haplotipos.*

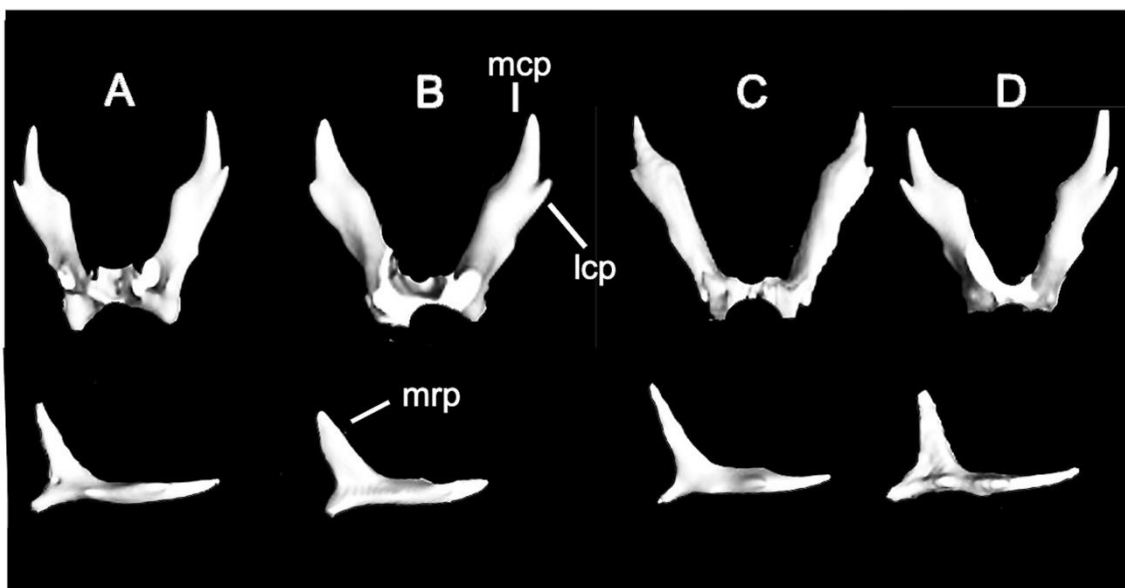
Species	Individuals	River	Drainage	GenBank Accession
<i>Cobitis calderoni</i> (population assignation)	1	Lozoya	Tagus	AY860122
<i>C. maroccana</i> *	5	Sebou	Sebou	OQ872759-63 ¹
<i>C. maroccana</i> *	1	Milan	Loukos	OQ872764 ¹
<i>C. vettonica</i>	20*	Mayas	Douro	OQ872589-98 ¹ ; OQ872599-608 ¹
<i>C. vettonica</i>	1	Malena	Douro	OQ872609 ¹ , KP161123
<i>C. vettonica</i>	1	Agueda	Douro	AY860181
<i>C. haasii</i> *	3	Serpis	Serpis	OQ872713-15 ¹
<i>C. haasii</i> *	3	Turia	Turia	OQ872716-18 ¹
<i>C. sp.1</i> Northwestern I.P. *	4	Cávado	Cávado	OQ872612-15 ¹
<i>C. sp.1</i> Northwestern I.P. *	2	Tea	Minho	OQ872616-17 ¹
<i>C. sp.1</i> Northwestern I.P. *	3	Arunca	Mondego	OQ872618-20 ¹
<i>C. sp.1</i> Northwestern I.P. *	1	Lis	Lis	AY860190
<i>C. sp.1</i> Northwestern I.P.*	3	Alcoa	Alcoa	OQ872685-87 ¹
<i>C. sp.2 Sizandro</i> *	10	Sizandro	Sizandro	AY860168-169; OQ872751-53 ¹ ; OQ872754-58 ¹
<i>C. sp.3 Valle</i> *	5	Valle	Valle	AY860180; OQ872765-68 ¹
<i>C. sp. Not assigned</i> *	10	Samarra	Samarra	OQ872688-90 ¹ OQ872691-97 ¹ ;
<i>C. sp. Not assigned</i> *	9	Alenquer	Tagus	OQ872704-12 ¹
<i>C. paludica</i>	1	Acebuche Lagoon	Acebuche Lagoon	AY860133
<i>C. paludica</i>	1	Aljibre	Aljibre	AY860125
<i>C. paludica</i> *	5	Odelouca	Arade	AY860126-27; OQ872698-700
<i>C. paludica</i> *	10	Huebra	Douro	OQ872636-44 ¹ ; AY860130
<i>C. paludica</i> *	5	Yeltes	Douro	OQ872645-49 ¹

<i>C. paludica</i> *	3	Gilao	Gilao	OQ872729-31 ¹
<i>C. paludica</i> *	4	Grande	Guadalhorce	OQ872668-71 ¹
<i>C. paludica</i> *	1	Fahala	Guadalhorce	AY860132
<i>C. paludica</i> *	4	Algarinejos	Guadalquivir	OQ872747-50 ¹
<i>C. paludica</i> *	4	Cabrillas	Guadalquivir	OQ872681-84 ¹
<i>C. paludica</i> *	6	Cala	Guadalquivir	AY860135; OQ872672-76 ¹
<i>C. paludica</i>	1	Guadalquivir	Guadalquivir	AY860137
<i>C. paludica</i>	1	Guadiato	Guadalquivir	AY860138
<i>C. paludica</i> *	4	Jándula	Guadalquivir	AY860139; OQ872726-28 ¹
<i>C. paludica</i>	2	Robledillo	Guadalquivir	AY860140-41
<i>C. paludica</i>	3	Alcudia	Guadiana	OQ872734-36 ¹
<i>C. paludica</i>	10	Azuer	Guadiana	OQ872658-67 ¹ ;
<i>C. paludica</i> *	4	Chanza	Guadiana	OQ872651-54 ¹
<i>C. paludica</i>	2	Cobres	Guadiana	OQ872732-33 ¹
<i>C. paludica</i> *	5	Jabalón	Guadiana	OQ872737-41 ¹
<i>C. paludica</i> *	8	Ruecas	Guadiana	AY860155-58; OQ872677-80 ¹
<i>C. paludica</i>	1	Santa María	Guadiana	AY860159
<i>C. paludica</i> *	3	Mariana	Júcar	OQ872655-57 ¹
<i>C. paludica</i>	1	Mira	Mira	AY860193
<i>C. paludica</i>	1	Odiaxere	Odiaxere	OQ872611 ¹
<i>C. paludica</i> *	3	Odiel	Odiel	OQ872719-21 ¹
<i>C. paludica</i> *	4	Quarteira	Quarteira	OQ872722-25 ¹
<i>C. paludica</i> *	3	Grandola	Sado	OQ872701-03 ¹ ;
<i>C. paludica</i> *	2	Louricais	Sado	AY860164, OQ872610 ¹
<i>C. paludica</i>	5	Albito	Tagus	MN583220-24
<i>C. paludica</i> *	1	Fuente del Roble Lagoon	Tagus	AF263074
<i>C. paludica</i>	1	Erjas	Tagus	OQ872650 ¹
<i>C. paludica</i> *	6	Gévalo	Tagus	OQ872742-46 ¹ ; AY860173
<i>C. paludica</i> *	16	Tiétar	Tagus	OQ872621-35 ¹ ; MH842915, AF263074

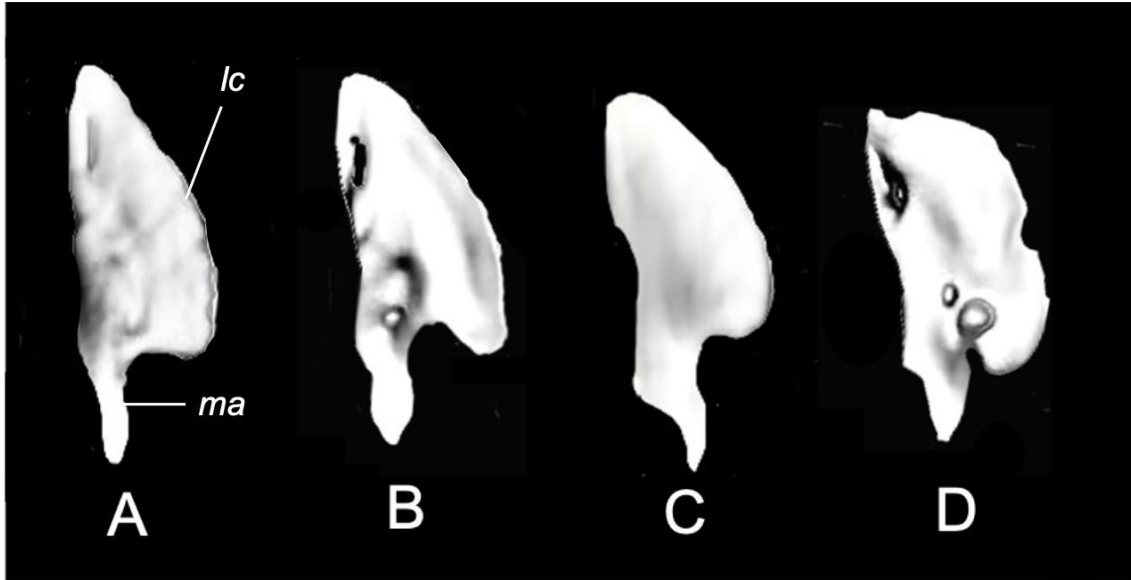
Appendix 4. Dorsal view of the skull of *Cobitis* populations under study: A, Sizandro; B, northwestern population; C, Valle River and D, Type locality of *C. paludica* (Fuente del Roble). *lp* lateral ethmoid. *fr* frontal. *f* fontanelle. *pa* parietal. *Vista dorsal del cráneo de las poblaciones estudiadas del género Cobitis. A, Sizandro; B, población del noroeste; C, río Valle y D, Localidad tipo de C. paludica (Fuente del Roble). lp etmoides lateral. fr frontal. f fontanela fronto-parietal. pa parietal*



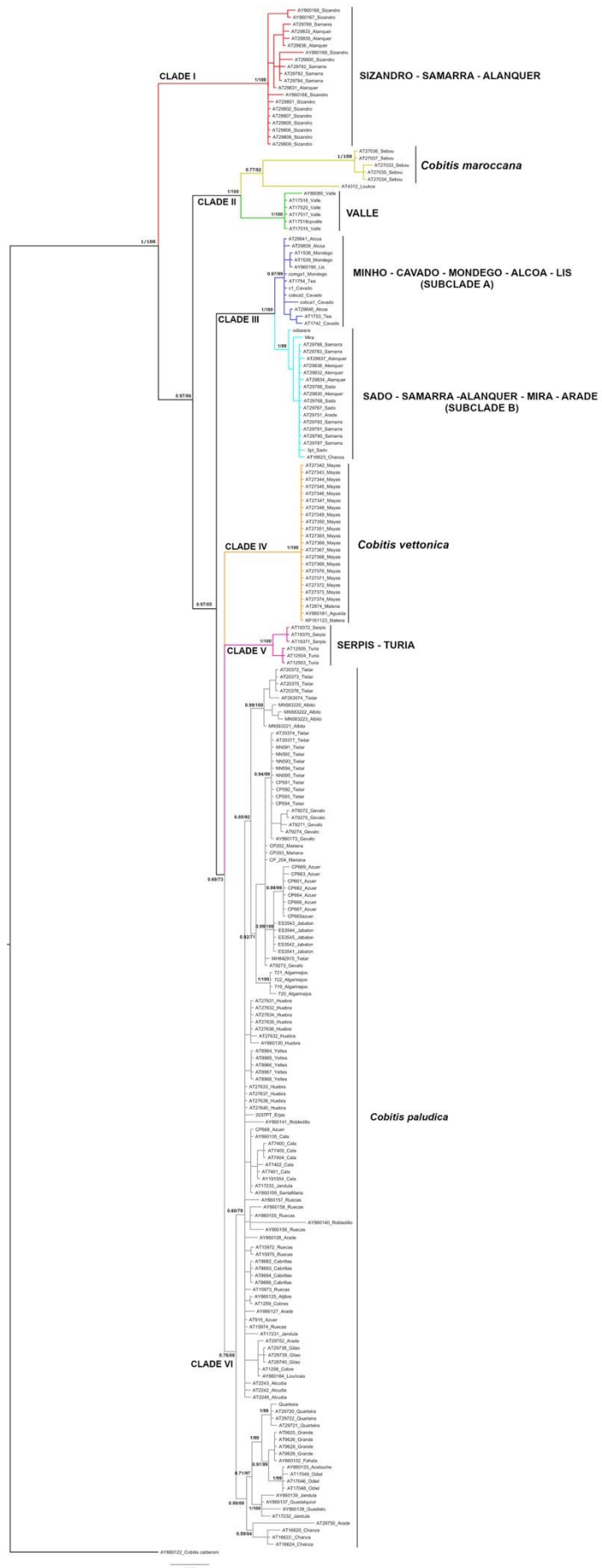
Appendix 5. Lateral ethmoid of *Cobitis* populations under study: A, Sizandro; B, northwestern population; C, Valle River and D, Type locality of *C. paludica* (Fuente del Roble). *mcp*, mediocaudal process. *lcp*, laterocaudal process. *mrp*, mediorostral process. *Etmoides lateral de las poblaciones estudiadas del género Cobitis. A, Sizandro; B, población del noroeste; C, río Valle y D, Localidad tipo de C. paludica (Fuente del Roble). mcp, apófisis mediocaudal. lcp, apófisis laterocaudal. mrp, apófisis mediorostral.*



Appendix 6. Canestrini scale of *Cobitis* populations under study: A, Sizandro; B, northwestern population; C, Valle River and D, Type locality of *C. paludica* (Fuente del Roble). *lc* lamina circularis. *ma* manubrium. *Escama de canestrini de las poblaciones estudiadas del género Cobitis. A, Sizandro; B, población del noroeste; C, río Valle y D, Localidad tipo de C. paludica (Fuente del Roble). lc* lamina circularis. *ma* manubrium.



Appendix 7. Phylogenetic tree rendered by Maximum Likelihood and Bayesian Inference based on *MT-CYB* gene, showing all analyzed sequences. Numbers on branches indicate posterior probability (before slash) and bootstrap (after slash) values. *Árbol filogenético generado por Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana a partir del gen MT-CYB, mostrando todas las secuencias analizadas. Los números en las ramas indican valores de probabilidad posterior (antes de la barra) y de bootstrap (después de la barra).*



Appendix 8.- Genetic patristic distances among the analyzed populations based on the *MT-CYB* gene. AN lineage: Northern lineage of the subclade A. *Distancias patristicas de las poblaciones analizadas para el gen MT-CYB. Linaje AN: linaje del norte del subclado A.*

	<i>C.vettonica</i>	<i>C.paludica</i>	Sado	<i>C. haasii</i>	AN.lineage	Clade I	<i>C. maroccana</i>	Valle	<i>C. calderoni</i>
<i>C. vettonica</i>	-	0.024	0.037	0.030	0.036	0.054	0.055	0.045	0.087
<i>C. paludica</i>		-	0.026	0.019	0.024	0.042	0.046	0.035	0.079
Sado			-	0.019	0.024	0.042	0.046	0.035	0.079
<i>C. haasii</i>				-	0.030	0.048	0.048	0.040	0.089
AN. lineage					-	0.049	0.050	0.039	0.088
Clade I						-	0.061	0.052	0.094
<i>C. maroccana</i>							-	0.037	0.091
Valle								-	0.091
<i>C. calderoni</i>									-

Appendix 9.- Autapomorphies in the cytochrome *b* gene detected for the genus *Cobitis*. Transversions are indicated with *. AN lineage: Northern lineage of the subclade A. *Autapomorfías detectadas en el citocromo b para el género Cobitis. Las transversiones son indicadas con *. AN lineage: Linaje norte del subclado A.*

	72	207	321	360	576	579	580	588	589	678	693	714	870	895	954	1023
<i>C. vettonica</i>	C	T	T	T	T	A	A	C	C	C	T	T	G	C	T	A
<i>C. paludica</i>	C	T	T	T	T	A	A	C	C	T	T	T	A	C	C	A
Sado	C	T	T	T	T	A	A	C	C	T	T/G	T	A	C	C	A
<i>C. haasii</i>	C	T	T	T	T	A	A	C	C	T	T	T	A	C	C	A
AN lineage	C	T	T	T	T	A	A	C	C	T	T	T	A	C	C	A
<i>C. mellaria</i>	C	T	T	C	T	A	A	C	C	T	T	A*	T*	C	C	A
<i>C. maroccana</i>	T	T	C	C	T	A	A	C	C	T	T	T	A	C	C	A
Valle	C	T	T	C	T	A	A	C	C	T	C	T	A	C	C	A
<i>C. calderoni</i>	C	C	T	A*	C	T	G	T	T	T	T	T	A	T	A	G