

# Genetics and the evolution of prezygotic isolation

Richard M. Merrill<sup>1\*</sup>, Henry Arenas-Castro<sup>2</sup>, Anna F. Feller,<sup>3,4</sup> Julia Harenčár<sup>5</sup>,  
Matteo Rossi<sup>1</sup>, Mathew A. Streisfeld<sup>6</sup> & Kathleen M. Kay<sup>5\*</sup>

1. Faculty of Biology, Division of Evolutionary Biology, LMU Munich, Grosshaderner Str. 2, 82152 Planegg-Martinsried, Germany
2. School of Biological Sciences, University of Queensland, St. Lucia, QLD 4072, Australia
3. Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, 26 Oxford St, Cambridge, MA 02138, USA
4. Arnold Arboretum of Harvard University, 1300 Centre St, Boston, MA 02131, USA
5. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Santa Cruz, 130 McAllister Way, Santa Cruz, CA 95060 USA
6. Institute of Ecology and Evolution, University of Oregon, 5289 Eugene, OR 97403-5289, USA

\*Corresponding authors.

Email addresses: RMM: merrill@bio.lmu.de; HA-C: henry.arenasc@gmail.com; AF: annafionafeller@gmail.com; JH: jharenca@ucsc.edu, MR: mrossi@rockefeller.edu; MS: mstreis@uoregon.edu; KMK: kmkay@ucsc.edu.

## Abstract

The significance of prezygotic isolation for speciation has been recognized at least since the Modern Synthesis. However, fundamental questions remain. For example, how are genetic associations between traits that contribute to prezygotic isolation maintained? What is the source of genetic variation underlying the evolution of these traits? And how do prezygotic barriers affect patterns of gene flow? We address these questions by reviewing genetic features shared across plants and animals that influence prezygotic isolation. Emerging technologies increasingly enable the identification and functional characterization of the genes involved, allowing us to test established theoretical expectations. Embedding these genes in their developmental context will allow further predictions about what constrains the evolution of prezygotic isolation. Ongoing improvements in statistical and computational tools will reveal how pre- and postzygotic isolation may differ in how they influence gene flow across the genome. Finally, we highlight opportunities for progress by combining theory with appropriate data.

## 39 **Introduction**

40 Prezygotic isolation includes all barriers to gene flow between populations that occur before  
41 fertilization. By acting early in the life cycle, prezygotic barriers are expected to have a  
42 disproportionate effect on overall reproductive isolation (RI), as they have the potential to  
43 limit gene flow before other barriers can act (Coyne and Orr 2004; Ramsey et al. 2003). A  
44 key goal of evolutionary genetics is to understand the historical, developmental, and  
45 ecological mechanisms that generate adaptive divergence and reproductive isolation.  
46 However, a major obstacle limiting our understanding of prezygotic isolation is that it tends  
47 to involve diverse phenotypes, including physiology, color, morphology, and behavior. In  
48 addition, the types of traits contributing to prezygotic isolation can vary among organisms,  
49 which has led to a lack of communication among scientists who work with different study  
50 systems.

51         In this chapter, we provide an overview of features shared across different organisms  
52 that may constrain or facilitate the evolution of prezygotic isolation. We begin with the  
53 classic problem of selection-recombination antagonism, how different types of allelic  
54 variation and genetic architecture may overcome it, and contributions of recent research in  
55 this area. We then focus on proximate considerations, including the origins of genetic  
56 variation and how its developmental context may constrain the evolution of prezygotic  
57 isolation. Finally, we consider how prezygotic barriers affect gene flow, and ask how we can  
58 distinguish their effects from those of postzygotic isolation. We conclude with opportunities  
59 we see for significant advances.

60

### 61 **Recombination as the key constraint on the evolution of prezygotic isolation.**

62 A rich body of theoretical work now exists concerning the evolution of prezygotic isolation  
63 (see Kirkpatrick and Ravigné 2002 and; Kopp et al. 2018 for excellent reviews). Although  
64 prezygotic isolation can evolve in allopatry (Knowlton et al. 1993; Langerhans et al. 2007),  
65 most models consider how speciation may proceed when populations continue to exchange  
66 alleles (whether under full sympatry, parapatry, or after secondary contact). This is not  
67 because allopatry is insignificant; given enough time, traits will diverge to the extent that  
68 populations may no longer interbreed if their ranges overlap again. However, as Felsenstein  
69 (1981) famously identified, when populations remain in contact, the evolution of prezygotic  
70 isolation faces a more fundamental genetic constraint. This is “recombination, which acts to

71 randomize the association between the prezygotic isolating mechanism (assortative mating)  
72 and the adaptations to the two environments” (Felsenstein 1981).

73 Despite Felsenstein’s skepticism, it is increasingly clear that speciation can proceed  
74 despite gene flow (Arnold 2015; Abbott et al. 2013; Pinho and Hey 2010). At the same time,  
75 there has been a renewed appreciation for the role of divergent natural selection in driving  
76 population divergence (Nosil 2012). These observations are related, because theory predicts  
77 that speciation with gene flow typically requires both the evolution of assortative mating *and*  
78 divergence in ecological traits (Kopp et al. 2018). While ‘ecology-free’ models of speciation  
79 with gene flow exist (e.g. Higashi et al. 1999), the assumptions are highly restrictive, and  
80 speciation with gene flow relying solely on sexual selection may be considered unrealistic  
81 (Kopp et al. 2018; but see Yang et al. 2019 for an example of a potentially widespread  
82 mechanism where sexual imprinting also causes divergent selection). Finally, speciation with  
83 gene flow also normally requires the maintenance of genetic associations (*i.e.* linkage  
84 disequilibrium, LD) between alleles that contribute to assortative mating and those under  
85 divergent selection. Together, these requirements present an enduring conceptual challenge:  
86 If populations continue to interbreed, recombination will break down LD between alleles for  
87 traits causing assortative mating and those under divergent selection (‘selection-  
88 recombination antagonism’) (Felsenstein 1981). In other words, gene flow will impede the  
89 evolution of prezygotic reproductive barriers that keep populations separate. The number and  
90 distribution of barrier loci (*i.e.* loci causing RI), and the nature of the alleles at these loci can  
91 profoundly influence the evolution of prezygotic isolation (Smadja and Butlin 2011).

92

### 93 **How many loci contribute to prezygotic isolation?**

94 One fundamental question we can ask about prezygotic isolation is, how many loci contribute  
95 to its evolution? Genetic architectures involving fewer loci of large effect are expected to be  
96 more robust to the homogenizing effects of gene flow than highly polygenic architectures, in  
97 which loci have individually small effects and are distributed broadly across the genome. This  
98 is because fewer loci offer fewer targets for recombination, and (correlational) selection is  
99 concentrated on fewer targets (Gavrilets 2004; Gavrilets and Vose 2007; Yeaman and  
100 Whitlock 2011).

101 Quantitative trait locus (QTL) mapping is one major tool used to identify loci  
102 contributing to RI and has improved our understanding of prezygotic isolation (reviewed in

103 Arbuthnott 2009; Widmer et al. 2009). However, QTL mapping has a number of well-known  
104 limitations. Although generating genetic markers is now relatively straightforward, the large  
105 number of phenotyped offspring required to robustly detect QTL is often difficult, limiting  
106 our ability to detect smaller effect QTL and resulting in upward biases in estimated effect  
107 sizes (Beavis et al. 1994). Resulting QTL may contain hundreds of genes, limiting our ability  
108 to estimate the number of mutations underlying traits or to distinguish pleiotropy from  
109 linkage (Shahandeh and Turner 2020). Moreover, studies in which no QTL are identified may  
110 remain unpublished, leading to a biased view of effect sizes.

111         There seems to be variation in the number and effect sizes of loci contributing to  
112 prezygotic isolation in both plants and animals, although QTL studies are difficult to compare  
113 directly, due to differences in methodology, sample size and the types of traits targeted.  
114 Mating cues and preferences in animals can be polygenic (Chenoweth and Blows 2006;  
115 Chenoweth and McGuigan 2010), but there is also evidence for loci of large effect (Merrill et  
116 al. 2019; Xu and Shaw 2019). Similarly, in flowering plants, floral isolation often involves a  
117 mix of large effect loci controlling color and scent with numerous small effect loci controlling  
118 morphology (Wessinger and Hileman 2020; Kay and Surget-Groba 2022; Klahre et al. 2011;  
119 Yuan et al. 2013). Divergence in habitat affinity contributing to ecogeographic isolation or  
120 immigrant inviability is likely to be highly polygenic due to the multivariate phenotypes  
121 involved (Savolainen et al. 2013; Barghi et al. 2020), but major effect loci have also been  
122 identified in some cases (e.g. Selby and Willis 2018; Colosimo et al. 2005).

123         Although they may provide greater resolution, genome-wide association studies  
124 (GWAS) and admixture mapping can also suffer from a lack of power and rely on the  
125 availability of naturally occurring variation. Combining mapping with functional tests and  
126 population genomic approaches, when feasible, may provide the best opportunity for  
127 understanding the genetic architecture of prezygotic isolation (Stinchcombe and Hoekstra  
128 2008; Bomblies and Peichel 2022). Comparative phylogenomic approaches may also provide  
129 a useful tool for understanding prezygotic barriers that have repeatedly evolved within a  
130 clade (Smith et al. 2020).

131

### 132 **What types of allelic variation contributes to prezygotic isolation?**

133 A second key contribution by Felsenstein (1981) was the observation that, regardless of the  
134 overall number of loci or the traits or taxa involved, prezygotic isolation *must* evolve at

135 individual genetic loci via either a ‘one-allele’ or a ‘two-allele’ mechanism (Felsenstein 1981;  
136 Figure 1). As noted elsewhere (Kopp et al. 2018; Butlin et al. 2021), these terms are often not  
137 well understood, but “the critical distinction . . . is whether reproductive isolation is  
138 strengthened by substituting the *same* or *different alleles* in the two nascent species”  
139 (Felsenstein 1981). These two mechanisms need not act in isolation, and variation in different  
140 components of prezygotic isolation, or even individual traits, may involve both one- and two-  
141 allele scenarios. Nevertheless, the distinction has important implications for the evolution of  
142 prezygotic isolation with gene flow, because when the same allele strengthens prezygotic  
143 isolation in both diverging populations (a one-allele mechanism), the requirement for LD  
144 between loci under divergent selection and those increasing assortative mating is side-  
145 stepped. Because such alleles will strengthen RI even if they are recombined into the other  
146 population, gene flow poses no obstacle to the substitution of alleles that increase isolation.

147         One-allele mechanisms are broadly accepted as the easiest route to strengthen  
148 prezygotic isolation in the face of gene flow (Butlin et al. 2021). Examples are potentially  
149 widespread, and could include alleles for increased choosiness, reduced migration, stronger  
150 imprinting, or decreased variance in flowering time. However, current empirical evidence for  
151 an explicit one-allele mechanism of prezygotic isolation is limited to a single experiment in  
152 flies. Ortíz-Barrientos and Noor (2005) first mapped within-species variation in female  
153 mating discrimination between *Drosophila pseudoobscura* populations, which are either  
154 sympatric or allopatric with respect to the sister species *D. persimilis*. They then tested for a  
155 one-allele assortative mating mechanism by introgressing either strong discrimination  
156 (sympatric) or weak discrimination (allopatric) alleles from *D. pseudoobscura* into *D.*  
157 *persimilis*. *Drosophila persimilis* females with the strong discrimination *D. pseudoobscura*  
158 alleles were much less likely to mate with heterospecific males than those with weak  
159 discrimination *D. pseudoobscura* alleles, directly showing that the same sympatric alleles  
160 could increase prezygotic isolation in both *D. pseudoobscura* and *D. persimilis* (but see  
161 Barnwell and Noor 2008 for a failed attempt at replication). These experiments highlight the  
162 difficulty of testing for one-allele mechanisms, especially because they rely on proxy  
163 ancestral populations, in this case the allopatric *D. pseudoobscura*, in experimentally  
164 tractable organisms.

165         Because one-allele mechanisms will be missed by typical approaches investigating  
166 differences between diverging taxa, understanding these mechanisms poses a significant

167 empirical challenge, and represents a major gap in the study of speciation genetics. We  
168 suggest using appropriate outgroups to identify derived traits and alleles shared among the  
169 ingroup that consistently increase assortative mating. This approach requires a careful  
170 understanding of how traits affect mating patterns, since phenotype-naïve approaches, such as  
171 genome scans, will miss these mechanisms. It may be that traits currently characterized as  
172 key innovations that increase speciation rates within clades are essentially one-allele  
173 mechanisms. For example, bilateral floral symmetry is associated with more specialized  
174 pollination and higher diversification rates (Kay et al. 2006; Yoder et al. 2020). Genetic  
175 studies across independent transitions from radial to bilateral floral symmetry have shown  
176 similar regulatory changes affecting *CYCLOIDEA*-like genes (reviewed in Hileman 2014),  
177 which may function as one-allele mechanisms strengthening reproductive isolation among  
178 taxa in these clades. This hypothesis could be tested through manipulations similar to those  
179 by Ortíz-Barrientos and Noor (2005) described above (or indirectly through phenotypic  
180 manipulation).

181

#### 182 **How are genetic associations between components of prezygotic isolation maintained?**

183 Where prezygotic isolation evolves via the substitution of different alleles in the diverging  
184 populations (a *two-allele* mechanism), LD between alleles under divergent selection and  
185 those underpinning components of assortative mating must be maintained. One way this can  
186 be achieved is if the same traits under divergent selection also contribute to assortative  
187 mating. Although such scenarios were considered unlikely (and hence referred to as ‘magic  
188 trait models’ (Gavrilets 2004)), it is now apparent that assortative mating traits are frequently  
189 under divergent selection (Servedio et al. 2011). For example, the bright wing patterns of  
190 *Heliconius* butterflies contribute to ecological postzygotic isolation, because hybrids with  
191 intermediate warning patterns are not recognized as distasteful, but they also act as cues  
192 during mate choice (Jiggins et al. 2001; Merrill et al. 2012). Similarly, in cichlid fish,  
193 adaptation of the visual sensory system to local environments has been hypothesized to  
194 contribute to divergent mate preferences (Seehausen et al. 2008; Maan et al. 2017). Floral  
195 isolation will also often fit a magic trait model, since divergent adaptation to local pollinators  
196 will naturally contribute to assortative mating. For example, flower color in monkeyflowers is  
197 under divergent selection by local pollinators, which simultaneously contributes to assortative  
198 mating (Schemske and Bradshaw 1999; Streisfeld and Kohn 2007).

199           Associations between traits involved in prezygotic isolation and those under divergent  
200 selection may also be maintained through genetic architectures that reduce recombination,  
201 such as tight genetic linkage, inversions, or pleiotropy (Felsenstein 1981; Wellenreuther and  
202 Bernatchez 2018; Huang and Rieseberg 2020; Maynard Smith 1966; Smadja and Butlin  
203 2011). Evidence exists for these kinds of genetic architectures, largely through QTL mapping  
204 studies. For example, Hawthorne and Via (2001) identified loci for host preference and  
205 performance in pea aphids that colocalized to the same regions of the genome. These insects  
206 mate on their host, providing a rapid path to speciation. Since then, others have reported  
207 evidence for physical linkage between loci underlying assortative mating and ecological  
208 traits, including in monkeyflowers (Ferris et al. 2017; Lowry and Willis 2010) and *Heliconius*  
209 butterflies (Merrill et al. 2019). An enduring question is whether physical linkage typically  
210 facilitates the substitution of coadapted alleles or whether structural rearrangements or  
211 recombination suppressors typically increase linkage after allelic substitutions (Charlesworth  
212 and Charlesworth 1979; Kirkpatrick and Barton 2006). To address this, one approach might  
213 be to examine homologous loci in an outgroup. For example, Hermann et al. (2013) found  
214 five tightly linked loci controlling differences in flower color, scent, and morphology in  
215 *Petunia* species adapted to hummingbird versus hawkmoth pollination. By examining the  
216 location of these loci in more distantly-related relatives, they show the linkage to be unique to  
217 *Petunia*, suggesting that structural rearrangements may have locked in these coadapted alleles  
218 (Hermann et al. 2013), although this needs to be confirmed by synteny studies with closer  
219 outgroups.

220           At a phenotypic level, assortative mating can be further characterized as following  
221 ‘trait-preference’ rules, where coordinated divergence in both male and female traits is  
222 necessary for assortative mating, or ‘matching rules’, in which individuals mate with like  
223 individuals on the basis of shared traits (Kopp et al. 2018). This has genetic consequences:  
224 whereas distinct male and female traits are likely to be controlled by different loci, phenotype  
225 matching will involve shared loci. Under the trait-preference scenario, which may be a  
226 common feature of behavioral isolation in animals, the number of genetic associations  
227 between loci required for prezygotic isolation to evolve is increased, impeding speciation  
228 (Smadja and Butlin 2011). In plants, pollen-pistil incompatibilities may be analogous to  
229 animal trait-preference systems. In these situations speciation may be facilitated by genetic  
230 structures, such as tight linkage or pleiotropy, that reduce the dissociation of male and female

231 traits (McNiven and Moehring 2013; Pryke 2010; Merrill et al. 2019; Xu and Shaw 2019).  
232 LD between unlinked trait and preference alleles will arise as a natural consequence of non-  
233 random mating (Kirkpatrick 1982), and if one of these components is subject to divergent  
234 selection (a ‘magic trait scenario’), it will also help overcome the selection-recombination  
235 antagonism. However, the strength of LD will depend on the effect size of ‘preference’  
236 alleles, and LD generated in these scenarios may not be robust to recombination without  
237 physical linkage or pleiotropy (Wiley et al. 2011). Nevertheless, compelling data are  
238 provided by corn borer moths, where alleles for pheromone variation and the corresponding  
239 preference are found at loci on different chromosomes but remain in strong LD (Unbehend et  
240 al. 2021; see also Hench et al. 2019).

241           When mating follows a matching rule, LD is required between fewer pairs of loci.  
242 Flower color is a likely widespread example (e.g. Schemske and Bradshaw 1999), because  
243 both male and female components of a hermaphroditic flower share the same signal to attract  
244 pollinators; however, divergence in other floral traits may also contribute to matching rules.  
245 For example, Kay and Surget-Groba (2022) found QTL for flower length divergence in two  
246 closely-related spiral ginger species, which simultaneously determines whether pollen is  
247 placed on, and then subsequently retrieved from, either the bill or forehead of the shared  
248 hummingbird pollinator. Other examples of matching rules come from habitat or ecological  
249 isolation, in which individuals with similar affinities mate because of spatial proximity and/or  
250 phenological overlap. A classic example involves phytophagous insects that mate on their  
251 host (Matsubayashi et al. 2010). In sticklebacks adapted to benthic and limnetic habitats  
252 within the same lake, Conte and Schluter (2013) revealed phenotype matching by  
253 manipulating body size. In the same system, Bay et al. (2017) found that female F2 hybrids  
254 mated with males that were similar in body size and shape, and mate choice QTL map to one  
255 of the same regions as benthic versus limnetic morphology, which is best explained under a  
256 scenario of phenotype matching. Since body size is under divergent selection in these fish,  
257 this example also corresponds to a magic trait model. In addition, although divergence in  
258 body size involves different alleles (a two-allele mechanism), assortative mating might  
259 conceivably be strengthened through the substitution of the same allele in both populations (a  
260 one-allele mechanism). As such, stickleback fish nicely demonstrate how these distinct  
261 concepts, involving matching rules, magic traits, and one- and two-allele mechanisms can  
262 simultaneously act within a single taxon pair (Figure 2).



263 Despite solid theoretical expectations, distinguishing among genetic mechanisms that  
264 contribute to prezygotic isolation in natural populations remains difficult. In most cases, it  
265 will be necessary to move beyond traditional mapping studies to incorporate gene expression,  
266 population genomic and functional genomic studies. For example, gene expression studies  
267 across *Heliconius* species revealed candidate genes underlying a mating preference QTL  
268 (Rossi et al. 2020) that were independently implicated as barrier loci through population  
269 genomic methods (Laetsch et al. 2022). These results suggest that tight linkage between these  
270 candidates and the color pattern gene responsible for mimicry (which was not found to be  
271 differentially expressed in the brains of these butterflies) is driving this isolation, rather than  
272 pleiotropy. Similarly, in monkeyflowers, a major-effect locus ('*YUP*') controlling pigment  
273 deposition (and the presence or absence of nectar guides that contribute to floral isolation)  
274 was mapped to a genomic region that also controls other floral traits and hybrid male sterility  
275 factors (Bradshaw et al. 1995; Bradshaw and Schemske 2003). *YUP* was resistant to further  
276 fine-scale genetic dissection because it occurs in a region of suppressed recombination  
277 (Fishman et al. 2013). Recently, however, Liang et al. (2023) used a combination of NIL  
278 construction, RNAseq, RNAi, transformation, complementation tests, confocal fluorescence  
279 microscopy, and comparative genomics to show that *YUP* produces small interfering RNAs  
280 (Liang et al. 2023). However, all these approaches depend on the prior identification of target  
281 loci, the ability to manipulate large numbers of experimental organisms, and a firm  
282 understanding of the phenotypes underlying prezygotic isolation.

283

### 284 **How is the evolution of prezygotic isolation constrained by evolutionary history and** 285 **development?**

286 Once we identify the genetic basis of traits contributing to prezygotic isolation, an important  
287 next step is to investigate the evolutionary history of these variants, which can have  
288 significant implications for determining the tempo and mode of speciation. Although classic  
289 models generally assume *de novo* mutation (reviewed in Orr 2005), it is now clear that  
290 preexisting, standing genetic variation can play an important role (Barrett and Schluter 2008).  
291 For example, repeated losses of lateral plates in freshwater stickleback populations were  
292 facilitated by existing variation at the *Eda* locus in ancestral marine populations (Colosimo et  
293 al. 2005; see Turbek et al. 2021 for a similar example in birds). Similarly, it is increasingly  
294 appreciated that hybridization and introgression can promote divergence via the reassembly

295 of old genetic variants into novel combinations (the “combinatorial view” of speciation  
296 Marques et al. 2019). Recent genomic data provide support for this mechanism, particularly  
297 in radiations of *Heliconius* butterflies, Darwin’s finches, cichlid fishes and monkeyflowers,  
298 where interspecific gene flow seems to have led to the exchange of beneficial alleles, thereby  
299 facilitating further divergence (Lamichhaney et al. 2015; Meier et al. 2017; Stankowski and  
300 Streisfeld 2015; The Heliconius Genome Consortium et al. 2012). Ancient hybridization may  
301 also have triggered entire adaptive radiations by generating new allelic combinations,  
302 followed by periods of sorting into distinct ecological environments, as seems to be the case  
303 for *opsin* gene evolution in Lake Victoria cichlids (Meier et al. 2017). Similarly, ancient  
304 hybridization is thought to have initiated the rapid evolution of host shifts among races of  
305 *Rhagoletis* flies (Feder et al. 2003).

306         Despite these examples of the origins of adaptive variation, a deeper understanding of  
307 the history of adaptive traits contributing to prezygotic isolation is possible when genetic  
308 studies are integrated with the field of evolutionary developmental biology (evo-devo). In  
309 particular, because organisms are constructed through genetic programs that unfold  
310 sequentially during development, pleiotropy can constrain the genetic changes that contribute  
311 to phenotypic evolution. Indeed, it has been argued that adaptation is more likely to proceed  
312 through changes in gene regulation, as these mutations are often less likely to incur fitness  
313 penalties due to pleiotropy compared to changes in protein-coding sequences (Stern and  
314 Orgogozo 2008; Prud’homme et al. 2007). Although emerging evidence suggests gene  
315 regulatory elements may be more pleiotropic than previously thought (Preger-Ben Noon et al.  
316 2018; Nagy et al. 2018; Lewis et al. 2019; Fuqua et al. 2020; Mazo-Vargas et al. 2022),  
317 diversification of numerous phenotypic traits, including those involved in prezygotic  
318 isolation, have often been linked to changes in gene regulation affecting development rather  
319 than mutations in protein-coding regions (Abzhanov et al. 2004; Martin et al. 2012; Reed et  
320 al. 2011; Unbehend et al. 2021). In addition, variation in gene regulatory network structure  
321 can greatly influence the trajectory of adaptation, potentially resulting in predictable  
322 evolutionary outcomes, including the re-use of certain types of mutations or specific genes  
323 (Martin and Orgogozo 2013; Sobel and Streisfeld 2013).

324         One example of how pleiotropy and gene regulatory network organization can impact  
325 the genetics of prezygotic isolation comes from flower color transitions causing pollinator  
326 isolation. Anthocyanins are common floral pigments responsible for red, pink, blue, and

327 purple flowers (Grotewold 2006). Most plants also produce anthocyanin in vegetative tissues,  
328 where they are involved in a variety of physiological responses to stress (Winkel-Shirley  
329 2002). The structural and regulatory components necessary for anthocyanin production are  
330 highly conserved, and the network coordinating regulation of the anthocyanin enzymes has  
331 become a paradigm for understanding combinatorial gene regulation in plants (Koes et al.  
332 2005). Three types of transcription factors form a multi-protein complex (known as the MBW  
333 complex) that regulates features of epidermal cell differentiation, including anthocyanin  
334 synthesis (Ramsay and Glover 2005). Among gene families that code for the proteins forming  
335 this complex, one (the R2R3-MYBs) contains multiple copies that are known to regulate  
336 anthocyanins (Stracke et al. 2001). These duplications result in redundancy of function and  
337 generate tissue-specificity in anthocyanin pigmentation. This redundancy implies that each  
338 MYB protein in the network has lower connectivity and fewer pleiotropic effects than other  
339 members of the MBW complex (Sobel and Streisfeld 2013) (Figure 3A). Indeed, despite the  
340 potential for mutations in numerous genes to generate similar flower color phenotypes, all  
341 examples involving divergence in floral anthocyanin pigment intensity between species have  
342 been caused by mutations in MYBs (Streisfeld and Rausher 2011). Thus, the organization of  
343 the MBW complex and the reduced pleiotropy of MYB mutations appear to determine which  
344 genes are most likely to be involved in prezygotic isolation.

345         The need to maintain functionality at higher levels of biological organization may also  
346 determine which mutations contribute to prezygotic isolation. For example, genetic changes  
347 in the sensory periphery of animals, particularly protein-coding changes in  
348 olfactory/gustatory receptors, have repeatedly been shown to underlie the evolution of  
349 behavioral isolation (Leary et al. 2012; Fan et al. 2013; Prieto-Godino et al. 2017; Ahmed et  
350 al. 2019; Brand et al. 2020). This could be because changes in chemoreceptor genes have  
351 fewer maladaptive effects on neural functioning compared to changes in downstream/central  
352 brain circuitry (Figure 3B). However, it remains uncertain whether these emerging patterns  
353 simply reflect bias arising from the experimental tractability of the sensory periphery (Cande  
354 et al. 2013; Zhao and McBride 2020), and whether they extend across different sensory  
355 modalities. More research is needed to confirm general patterns underlying the evolutionary  
356 history of behavioral alleles involved in prezygotic isolation. For example, changes in central  
357 neural circuitry downstream of sensory receptors are also involved in the evolution of  
358 divergent olfactory-guided mating preferences between species (Seeholzer et al. 2018;

359 Khallaf et al. 2020). In conclusion, like other forms of phenotypic evolution, the genetic  
360 source of the traits contributing to RI will probably be the result of evolutionary forces that  
361 favor alleles with minimal pleiotropic effects, while maximizing adaptive shifts in a given  
362 environment.

363

#### 364 **How do prezygotic barriers affect gene flow?**

365 While identifying the loci contributing to prezygotic isolation is important for testing  
366 longstanding questions about the genetics of speciation, ultimately we want to know the  
367 extent to which prezygotic barriers reduce gene flow between diverging populations.  
368 Estimates of the strength of RI are intended to quantify the reduction in potential gene flow  
369 between populations (Coyne and Orr 2004; Sobel and Chen 2014). Although measuring the  
370 components of RI has proven useful for comparing the prevalence and strength of different  
371 types of barriers across systems (Coyne and Orr 1997; Christie et al. 2022), we still know  
372 little about how the strength of RI corresponds to reduced gene flow. A lack of any RI should  
373 result in genetic homogenization, whereas complete RI should impede all gene flow, allowing  
374 populations to evolve independently. However, at intermediate values, as is commonly found  
375 between taxon-pairs exhibiting at least some geographic overlap, RI may not have a linear  
376 relationship with gene flow. Importantly, with incomplete RI, patterns of gene flow and/or  
377 divergence across the genome may be complex and vary among neutral loci, loci under  
378 divergent selection, and loci linked to selected loci (Nosil and Feder 2012; Cruickshank and  
379 Hahn 2014). The genetic architecture of RI and local recombination rates will also determine  
380 how and when divergently selected loci remain distinct in the face of gene flow (Schumer et  
381 al. 2018; Kautt et al. 2020). Therefore, understanding the relationship between the strength  
382 and type of prezygotic barriers and realized gene flow across the genome is critical for  
383 understanding the circumstances under which prezygotic isolation will cause speciation.

384         Pre- and postzygotic isolation may have different impacts on gene flow. Early-acting  
385 prezygotic barriers may be more effective at preventing gene flow since they preclude hybrid  
386 formation and act early in the life cycle before other barriers can operate (Coyne and Orr  
387 1997; Ramsey et al. 2003). However, they may also vary in strength with the ecological  
388 context more so than postzygotic barriers (e.g. Hausmann et al. 2021; Sianta and Kay 2021).  
389 In contrast, intrinsic postzygotic barriers are expected to be consistent across environments,  
390 but hybrids, especially beyond the F1 generation, may show extensive genotypic, phenotypic

391 and fitness variation, such that overall gene flow may be extensive even when mean hybrid  
392 fitness is low (reviewed in Arnold et al. 2012; Rieseberg et al. 1999). In many cases, the  
393 impact of prezygotic isolation on gene flow will be confounded with that of postzygotic  
394 barriers, either through their independent effects on gene flow in the same taxon pair or by the  
395 same traits contributing to both prezygotic and extrinsic postzygotic isolation.

396 A further challenge to understanding the effects of prezygotic isolation on gene flow  
397 is that population genetic studies vary widely in design and methodology, so they are often  
398 difficult to compare. Specifically, the types of markers used, including their coverage across  
399 the genome and level of polymorphism, as well as population sampling, will impact estimates  
400 of gene flow (reviewed in Westram et al. 2022). Analytical methods for assessing gene flow  
401 also vary widely. Many studies that make conclusions about gene flow only report patterns of  
402 genetic divergence within and between taxa, but this may be confounded by shared ancestry  
403 and within-population characteristics, like population size and mating system. Few studies  
404 directly assess migration rates, or even more importantly, variation in migration rates across  
405 the genome. With whole-genome data, demographic modeling can be used to estimate a  
406 variety of population parameters, including directional migration rates and variation in  
407 migration rate across the genome (e.g. Gutenkunst et al. 2009; Excoffier et al. 2021; Laetsch  
408 et al. 2022). However, the field has yet to coalesce around a standard approach (reviewed in  
409 Westram et al. 2022). Thus, deposition of raw data into public repositories is key for future  
410 comparative analyses of the complex relationships between gene flow and RI.

411 One way to circumvent the variability in sampling and analysis may be to assess both  
412 directional gene flow and directional estimates of prezygotic isolation within the same study  
413 (e.g. Sundqvist et al. 2016). For example, focusing on interspecific pollen transfer in plants,  
414 Moreira-Hernández and Muchhala (2019) compared the strength and asymmetry of  
415 prezygotic barriers to the predominant direction of gene flow for ten systems. They found that  
416 only four out of ten systems showed concordance in asymmetry direction between pollen  
417 transfer barriers and gene flow, three showed contradictory patterns, and the rest were mixed.  
418 In two of the three cases where patterns did not match, postzygotic barriers were responsible  
419 for the observed pattern of gene flow. Another example comes from sunflowers, in which  
420 Sambatti et al. (2012) found substantial gene flow between the two focal species despite very  
421 high prezygotic isolation and nearly complete cumulative RI. The directionality of gene flow  
422 does not match asymmetry in prezygotic isolation, again potentially due to opposing

423 asymmetry in postzygotic isolation. These examples highlight the importance of considering  
424 both pre- and postzygotic barriers in the same system to disentangle their impacts on gene  
425 flow. Future investigation into the efficacy of prezygotic barriers could benefit from focusing  
426 on systems in which postzygotic isolation is known to be weak or absent.

427         The complementary viewpoint to asking how prezygotic isolation relates to gene flow  
428 is to ask whether patterns of gene flow or genetic divergence can help us understand the traits  
429 or loci contributing to reproductive isolation. Genome scans can help identify loci under  
430 divergent selection that may contribute to prezygotic isolation and that conform to two-allele  
431 models of RI, although they must be interpreted carefully to avoid confounding factors and  
432 false positives (Marigorta et al. 2018). Heterogeneous patterns of genomic divergence have  
433 been found in a variety of systems (e.g. Westram et al. 2018; Martin et al. 2013; Vijay et al.  
434 2016; Poelstra et al. 2014; Malinsky et al. 2015; Riesch et al. 2017; Marques et al. 2016), but  
435 rarely do we have corresponding information on the traits contributing to RI to connect with  
436 these patterns (but see Stankowski et al. 2023 for an attempt to do this).

437

## 438 **Conclusions**

439 Despite decades of progress in understanding the genetics of prezygotic isolation, we see  
440 opportunities for future advances. Improved genetic, genomic, and phenotyping technologies  
441 will allow finer dissection and functional characterization of prezygotic isolation, providing  
442 answers to basic questions about its genetic architecture across varied systems and helping us  
443 move beyond difficult-to-compare QTL studies (See also chapter by Delmore et al., this  
444 volume) We highlight a gap between the theoretical expectation that one-allele mechanisms  
445 provide the easiest route for prezygotic isolation to evolve in the face of gene flow, and our  
446 ability to detect this type of genetic variation with prevailing approaches that characterize  
447 differences between species. We also see opportunities for further integration of evo-devo  
448 with speciation genetics. Understanding the developmental programs in which prezygotic  
449 isolating traits are embedded will lead to better predictions about constraints on their  
450 evolution. In addition, there remains much work to be done to understand how both pre- and  
451 postzygotic isolation shape gene flow and patterns of genetic divergence across the genome.  
452 The increasing accessibility of whole genome sequencing and development of computational  
453 approaches to explicitly estimate migration rates will make it possible to compare the  
454 strength of RI with levels of gene flow across multiple taxa and types of isolating barriers.

455

456 Finally, we included examples across plants and animals, in the hope of better integrating our  
457 understanding of prezygotic isolation. We believe this highlights common principles despite  
458 divergent biologies. Whether there are substantial differences in the genetics of prezygotic  
459 isolation among taxonomic groups independent of methodological biases remains an open  
460 question.

461

#### 462 **Open questions for future research?**

- 463 • How many loci, at the level of individual mutations, contribute to the evolution of  
464 prezygotic isolation? How are they distributed across the genome? And how does this  
465 vary with respect to taxonomic group, levels of gene flow, and the types selection  
466 driving divergence etc.?
- 467 • How important are the different mechanisms that can overcome the fundamental  
468 constraint of recombination? In particular, how common are one-allele mechanisms in  
469 nature?
- 470 • Is physical linkage between loci, and other recombination suppressors, a cause or  
471 consequence of speciation? And can we distinguish between tight linkage and  
472 pleiotropy?
- 473 • How does development, and the need to maintain functionality at higher levels of  
474 biological organization, constrain the evolution of prezygotic isolation?
- 475 • How do prezygotic barriers shape patterns of genetic divergence across the genome,  
476 and is this different to patterns associated with postzygotic barriers?

477

#### 478 **Acknowledgements**

479 We would like to thank A. Holtz for citation management. The authors were funded by the  
480 following sources while working on this project: H.A.C. Australian Research Council  
481 DP190103039; M.R. & R.M.M. DFG GZ: ME 4845/1-1; R.M.M. ERC Starter Grant 851040;  
482 K.M.K and J.G.H. NSF DEB 1737889; M.A.S. NSF DEB 2051242; A.F.F. Swiss National  
483 Science Foundation Postdoc Mobility Grant 203023.

484

#### 485 **Author Contributions**

486 All authors contributed to conceptual development, writing and generating figures.

487

488

## References

- 489 Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A,  
490 Buerkle CA, Buggs R, et al. 2013. Hybridization and speciation. *J Evol Biol* **26**: 229–  
491 246.
- 492 Abzhanov A, Protas M, Grant BR, Grant PR, Tabin CJ. 2004. Bmp4 and morphological  
493 variation of beaks in Darwin's finches. *Science* **305**: 1462–1465.
- 494 Ahmed OM, Avila-Herrera A, Tun KM, Serpa PH, Peng J, Parthasarathy S, Knapp J-M,  
495 Stern DL, Davis GW, Pollard KS, et al. 2019. Evolution of mechanisms that control  
496 mating in *Drosophila* males. *Cell Rep* **27**: 2527–2536.
- 497 Arbuthnott D. 2009. The genetic architecture of insect courtship behavior and premating  
498 isolation. *Heredity* **103**: 15–22.
- 499 Arnold ML, ed. 2015. Divergence with genetic exchange. In *Divergence with Genetic*  
500 *Exchange*, Oxford University Press.
- 501 Arnold ML, Ballerini ES, Brothers AN. 2012. Hybrid fitness, adaptation and evolutionary  
502 diversification: lessons learned from Louisiana Irises. *Heredity* **108**: 159–166.
- 503 Barghi N, Hermisson J, Schlötterer C. 2020. Polygenic adaptation: a unifying framework to  
504 understand positive selection. *Nat Rev Genet* **21**: 769–781.
- 505 Barnwell CV, Noor MAF. 2008. Failure to replicate two mate preference QTLs across  
506 multiple strains of *Drosophila pseudoobscura*. *J Hered* **99**: 653–656.
- 507 Barrett R, Schluter D. 2008. Adaptation from standing genetic variation. **23**: 38–44.
- 508 Bay RA, Arnegard ME, Conte GL, Best J, Bedford NL, McCann SR, Dubin ME, Chan YF,  
509 Jones FC, Kingsley DM, et al. 2017. Genetic coupling of female mate choice with  
510 polygenic ecological divergence facilitates stickleback speciation. *Curr Biol* **27**: 3344–



511 3349.e4.

512 Beavis WD, Smith OS, Grant D, Fincher R. 1994. Identification of quantitative trait loci  
513 using a small sample of topcrossed and F4 progeny from maize. *Crop Sci* **34**: 882–  
514 896

515 Bomblies K, Peichel CL. 2022. Genetics of adaptation. *Proc Natl Acad Sci* **119**:  
516 e2122152119.

517 Bradshaw HD, Schemske DW. 2003. Allele substitution at a flower colour locus produces a  
518 pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* **426**: 176–178.

519 Bradshaw HD, Wilbert SM, Otto KG, Schemske DW. 1995. Genetic mapping of floral traits  
520 associated with reproductive isolation in monkeyflowers (*Mimulus*). *Nature* **376**: 762–  
521 765.

522 Brand P, Hinojosa-Díaz IA, Ayala R, Daigle M, Yurrita Obiols CL, Eltz T, Ramírez SR.  
523 2020. The evolution of sexual signaling is linked to odorant receptor tuning in  
524 perfume-collecting orchid bees. *Nat Commun* **11**: 244.

525 Butlin RK, Servedio MR, Smadja CM, Bank C, Barton NH, Flaxman SM, Giraud T, Hopkins  
526 R, Larson EL, Maan ME, et al. 2021. Homage to Felsenstein 1981, or why are there  
527 so few/many species? *Evolution* **75**: 978–988.

528 Cande J, Prud'homme B, Gompel N. 2013. Smells like evolution: the role of chemoreceptor  
529 evolution in behavioral change. *Curr Opin Neurobiol* **23**: 152–158.

530 Charlesworth D, Charlesworth B. 1979. Selection on recombination in clines. *Genetics* **91**:  
531 581–589.

532 Chenoweth SF, Blows MW. 2006. Dissecting the complex genetic basis of mate choice. *Nat*  
533 *Rev Genet* **7**: 681–692.

534 Chenoweth SF, McGuigan K. 2010. The genetic basis of sexually selected variation. *Annu*

535 *Rev Ecol Evol Syst* **41**: 81–101.

536 Christie K, Fraser LS, Lowry DB. 2022. The strength of reproductive isolating barriers in  
537 seed plants: insights from studies quantifying premating and postmating reproductive  
538 barriers over the past 15 years. *Evolution* **76**: 2228–2243.

539 Colosimo PF, Hosemann KE, Balabhadra S, Villarreal G, Dickson M, Grimwood J, Schmutz  
540 J, Myers RM, Schluter D, Kingsley DM. 2005. Widespread parallel evolution in  
541 sticklebacks by repeated fixation of ectodysplasin alleles. *Science* **307**: 1928–1933.

542 Conte GL, Schluter D. 2013. Experimental confirmation that body size determines mate  
543 preference via phenotype matching in a stickleback species pair. *Evolution* **67**: 1477–  
544 1484.

545 Coyne JA, Orr HA. 1997. “Patterns of speciation in *Drosophila*” revisited. *Evolution* **51**:  
546 295–303.

547 Coyne JA, Orr HA. 2004. *Speciation*. Oxford University Press, Oxford, New York.

548 Cruickshank TE, Hahn MW. 2014. Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are  
549 due to reduced diversity, not reduced gene flow. *Mol Ecol* **23**: 3133–3157.

550 Excoffier L, Marchi N, Marques DA, Matthey-Doret R, Gouy A, Sousa VC. 2021.  
551 Fastsimcoal2: demographic inference under complex evolutionary scenarios.  
552 *Bioinformatics* **37**: 4882–4885.

553 Fan P, Manoli DS, Ahmed OM, Chen Y, Agarwal N, Kwong S, Cai AG, Neitz J, Renslo A,  
554 Baker BS, et al. 2013. Genetic and neural mechanisms that inhibit *Drosophila* from  
555 mating with other species. *Cell* **154**: 89–102.

556 Feder JL, Berlocher SH, Roethele JB, Dambroski H, Smith JJ, Perry WL, Gavrilovic V,  
557 Filchak KE, Rull J, Aluja M. 2003. Allopatric genetic origins for sympatric host-plant  
558 shifts and race formation in *Rhagoletis*. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 10314–10319.

559 Felsenstein J. 1981. Skepticism towards Santa Rosalia, or why are there so few kinds of  
560 animals? *Evolution* **35**: 124–138.

561 Ferris KG, Barnett LL, Blackman BK, Willis JH. 2017. The genetic architecture of local  
562 adaptation and reproductive isolation in sympatry within the *Mimulus guttatus* species  
563 complex. *Mol Ecol* **26**: 208–224.

564 Fishman L, Stathos A, Beardsley PM, Williams CF, Hill JP. 2013. Chromosomal  
565 rearrangements and the genetics of reproductive barriers in *Mimulus*  
566 (monkeyflowers). *Evol Int J Org Evol* **67**: 2547–2560.

567 Fuqua T, Jordan J, van Breugel ME, Halavatyi A, Tischer C, Polidoro P, Abe N, Tsai A,  
568 Mann RS, Stern DL, et al. 2020. Dense and pleiotropic regulatory information in a  
569 developmental enhancer. *Nature* **587**: 235–239.

570 Gavrilets S. 2004. *Fitness landscapes and the origin of species*. Princeton University Press,  
571 Princeton, New Jersey.

572 Gavrilets S, Vose A. 2007. Case studies and mathematical models of ecological speciation. 2.  
573 palms on an oceanic island. *Mol Ecol* **16**: 2910–2921.

574 Grotewold E, ed. 2006. *The science of flavonoids*. Springer, New York, NY  
575 <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-28822-2>.

576 Gutenkunst RN, Hernandez RD, Williamson SH, Bustamante CD. 2009. Inferring the joint  
577 demographic history of multiple populations from multidimensional SNP frequency  
578 data. *PLOS Genet* **5**: e1000695.

579 Hausmann AE, Kuo C-Y, Freire M, Rueda-M N, Linares M, Pardo-Diaz C, Salazar C,  
580 Merrill RM. 2021. Light environment influences mating behaviours during the early  
581 stages of divergence in tropical butterflies. *Proc R Soc B Biol Sci* **288**: 20210157.

582 Hawthorne DJ, Via S. 2001. Genetic linkage of ecological specialization and reproductive

583 isolation in pea aphids. *Nature* **412**: 904–907.

584 Hench K, Vargas M, Höppner MP, McMillan WO, Puebla O. 2019. Inter-chromosomal  
585 coupling between vision and pigmentation genes during genomic divergence. *Nat*  
586 *Ecol Evol* **3**: 657–667.

587 Hermann K, Klahre U, Moser M, Sheehan H, Mandel T, Kuhlemeier C. 2013. Tight genetic  
588 linkage of prezygotic barrier loci creates a multifunctional speciation island in  
589 *Petunia*. *Curr Biol* **23**: 873–877.

590 Higashi M, Takimoto G, Yamamura N. 1999. Sympatric speciation by sexual selection.  
591 *Nature* **402**: 523–526.

592 Hileman LC. 2014. Trends in flower symmetry evolution revealed through phylogenetic and  
593 developmental genetic advances. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **369**: 20130348.

594 Huang K, Rieseberg LH. 2020. Frequency, origins, and evolutionary role of chromosomal  
595 inversions in plants. *Front Plant Sci* **11**

596 Jamie G, Van Bellegham SM, Hogan BG, Hamama S, Moya C, Troscianko J, Stoddard MS,  
597 Kilner RM, Spottiswoode CN. 2020. Multimodal mimicry of hosts in a radiation of  
598 parasitic finches. *Evolution*. 74: 2526-2538.

599 Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL, Mallet J. 2001. Reproductive isolation caused by colour  
600 pattern mimicry. *Nature* **411**: 302–305.

601 Kautt AF, Kratochwil CF, Nater A, Machado-Schiaffino G, Olave M, Henning F, Torres-  
602 Dowdall J, Härer A, Hulsey CD, Franchini P, et al. 2020. Contrasting signatures of  
603 genomic divergence during sympatric speciation. *Nature* **588**: 106–111.

604 Kay KM, Surget-Groba Y. 2022. The genetic basis of floral mechanical isolation between  
605 two hummingbird-pollinated neotropical understorey herbs. *Mol Ecol* **31**: 4351–4363.

606 Kay KM, Voelckel C, Yang JY, Hufford KM, Kaska DD, Hodges SA. 2006. Floral characters

607 and species diversification. In *Ecology and Evolution of Flowers* (eds. L.D. Harder  
608 and S.C.H. Barrett), pp. 311–325, Oxford University Press, Oxford.

609 Khallaf MA, Auer TO, Grabe V, Depetris-Chauvin A, Ammagarahalli B, Zhang D-D,  
610 Lavista-Llanos S, Kaftan F, Weißflog J, Matzkin LM, et al. 2020. Mate discrimination  
611 among subspecies through a conserved olfactory pathway. *Sci Adv* **6**: eaba5279.

612 Kirkpatrick M. 1982. Sexual selection and the evolution of female choice. *Evolution* **36**: 1–  
613 12.

614 Kirkpatrick M, Barton N. 2006. Chromosome inversions, local adaptation and speciation.  
615 *Genetics* **173**: 419–434.

616 Kirkpatrick M, Ravigné V. 2002. Speciation by natural and sexual selection: models and  
617 experiments. *Am Nat* **159**: S22–S35.

618 Klahre U, Gurba A, Hermann K, Saxenhofer M, Bossolini E, Guerin PM, Kuhlemeier C.  
619 2011. Pollinator choice in *Petunia* depends on two major genetic loci for floral scent  
620 production. *Curr Biol* **21**: 730–739.

621 Knowlton N, Weigt LA, Solórzano LA, Mills DK, Bermingham E. 1993. Divergence in  
622 proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the isthmus of  
623 Panama. *Science* **260**: 1629–1632.

624 Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation  
625 and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* **10**: 236–242.

626 Kopp M, Servedio MR, Mendelson TC, Safran RJ, Rodríguez RL, Hauber ME, Scordato EC,  
627 Symes LB, Balakrishnan CN, Zonana DM, et al. 2018. Mechanisms of assortative  
628 mating in speciation with gene flow: connecting theory and empirical research. *Am*  
629 *Nat* **191**: 1–20.

630 Laetsch DR, Bisschop G, Martin SH, Aeschbacher S, Setter D, Lohse K. 2022.

631 Demographically explicit scans for barriers to gene flow using gIMble.  
632 2022.10.27.514110. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.10.27.514110v1>.

633 Lamichhaney S, Berglund J, Almén MS, Maqbool K, Grabherr M, Martinez-Barrio A,  
634 Promerová M, Rubin C-J, Wang C, Zamani N, et al. 2015. Evolution of Darwin's  
635 finches and their beaks revealed by genome sequencing. *Nature* **518**: 371–375.

636 Langerhans RB, Gifford ME, Joseph EO. 2007. Ecological speciation in *Gambusia* fishes.  
637 *Evolution* **61**: 2056–2074.

638 Leary GP, Allen JE, Bungler PL, Luginbill JB, Linn CE, Macallister IE, Kavanaugh MP,  
639 Wanner KW. 2012. Single mutation to a sex pheromone receptor provides adaptive  
640 specificity between closely related moth species. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 14081–  
641 14086.

642 Lewis JJ, Geltman RC, Pollak PC, Rondem KE, Van Belleghem SM, Hubisz MJ, Munn  
643 PM, Zhang L, Benson C, Mazo-Vargas A1, Danko CG, Counterman BA, Papa R,  
644 Reed R 2019 Parallel evolution of ancient, pleiotropic enhancers underlies butterfly  
645 wing pattern mimicry/ *Proc Natl Acad Sci* **116** 4174-24183;

646 Liang M, Chen W, LaFountain AM, Liu Y, Peng F, Xia R, Bradshaw HD, Yuan Y-W. 2023.  
647 Taxon-specific, phased siRNAs underlie a speciation locus in monkeyflowers. *Science*  
648 **379**: 576–582.

649 Lowry DB, Willis JH. 2010. A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes  
650 to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation. *PLoS*  
651 *Biol* **8**: e1000500.

652 Maan ME, Seehausen O, Groothuis TGG. 2017. Differential survival between visual  
653 environments supports a role of divergent sensory drive in cichlid fish speciation. *Am*  
654 *Nat* **189**: 78–85.

655 Malinsky M, Challis RJ, Tyers AM, Schiffels S, Terai Y, Ngatunga BP, Miska EA, Durbin R,  
656 Genner MJ, Turner GF. 2015. Genomic islands of speciation separate cichlid  
657 ecomorphs in an East African crater lake. *Science* **350**: 1493–1498.

658 Marigorta UM, Rodríguez JA, Gibson G, Navarro A. 2018. Replicability and prediction:  
659 lessons and challenges from GWAS. *Trends Genet* **34**: 504–517.

660 Marques DA, Lucek K, Meier JI, Mwaiko S, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O. 2016.  
661 Genomics of rapid incipient speciation in sympatric threespine stickleback. *PLOS*  
662 *Genet* **12**: e1005887.

663 Marques DA, Meier JI, Seehausen O. 2019. A combinatorial view on speciation and adaptive  
664 radiation. *Trends Ecol Evol* **34**: 531–544.

665 Martin A, Orgogozo V. 2013. The loci of repeated evolution: a catalog of genetic hotspots of  
666 phenotypic variation. *Evolution* **67**: 1235–1250.

667 Martin A, Papa R, Nadeau NJ, Hill RI, Counterman BA, Halder G, Jiggins CD, Kronforst  
668 MR, Long AD, McMillan WO, et al. 2012. Diversification of complex butterfly wing  
669 patterns by repeated regulatory evolution of a Wnt ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
670 **109**: 12632–12637.

671 Martin SH, Dasmahapatra KK, Nadeau NJ, Salazar C, Walters JR, Simpson F, Blaxter M,  
672 Manica A, Mallet J, Jiggins CD. 2013. Genome-wide evidence for speciation with  
673 gene flow in *Heliconius* butterflies. *Genome Res* **23**: 1817–1828.

674 Matsubayashi KW, Ohshima I, Nosil P. 2010. Ecological speciation in phytophagous insects.  
675 *Entomol Exp Appl* **134**: 1–27.

676 Maynard Smith J. 1966. Sympatric speciation. *Am Nat* **100**: 637–650.

677 Mazo-Vargas A, Langmüller AM, Wilder A, van der Burg KRL, Lewis JJ, Messer PW,  
678 Zhang L, Martin A, Reed RD. 2022. Deep cis-regulatory homology of the butterfly

679 wing pattern ground plan. *Science* **378**: 304–308.

680 McNiven VTK, Moehring AJ. 2013. Identification of genetically linked female preference  
681 and male trait. *Evolution* **67**: 2155–2165.

682 Meier JI, Marques DA, Mwaiko S, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O. 2017. Ancient  
683 hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations. *Nat Commun* **8**: 14363.

684 Merrill RM, Rastas P, Martin SH, Melo MC, Barker S, Davey J, McMillan WO, Jiggins CD.  
685 2019. Genetic dissection of assortative mating behavior. *PLOS Biol* **17**: e2005902.

686 Merrill RM, Wallbank RWR, Bull V, Salazar PCA, Mallet J, Stevens M, Jiggins CD. 2012.  
687 Disruptive ecological selection on a mating cue. *Proc R Soc B Biol Sci* **279**: 4907–  
688 4913.

689 Moreira-Hernández JI, Muchhala N. 2019. Importance of pollinator-mediated interspecific  
690 pollen transfer for angiosperm evolution. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **50**: 191–217.

691 Nagy, O, Nuez I, Savisaar, R, Peluffo AE, Yassin A, Lang M, Stern DL, Matute D,  
692 David JR, Courtier-Orgogozo V. Correlated Evolution of Two Copulatory Organs via  
693 a Single *cis*-Regulatory Nucleotide Change. *Curr Biol* **28**: 3450-3457

694 Nosil P. 2012. *Ecological speciation*. Oxford University Press, Oxford ; New York.

695 Nosil P, Feder JL. 2012. Widespread yet heterogeneous genomic divergence. *Mol Ecol* **21**:  
696 2829–2832.

697 Orr HA. 2005. The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nat Rev Genet* **6**: 119–127.

698 Ortíz-Barrientos D, Noor MAF. 2005. Evidence for a one-allele assortative mating locus.  
699 *Science* **310**: 1467–1467.

700 Pinho C, Hey J. 2010. Divergence with gene flow: models and data. *Annu Rev Ecol Evol Syst*  
701 **41**: 215–230.

702 Podos J. 2001. Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin’s  
703 finches. *Nature* **409**: 185–188.



704 Poelstra JW, Vijay N, Bossu CM, Lantz H, Ryll B, Müller I, Baglione V, Unneberg P,  
705 Wikelski M, Grabherr MG, et al. 2014. The genomic landscape underlying  
706 phenotypic integrity in the face of gene flow in crows. *Science* **344**: 1410–1414.

707 Preger-Ben Noon E, Sabarís G, Ortiz DM, Sager J, Liebowitz A, Stern DL, Frankel N. 2018.  
708 Comprehensive analysis of a cis-regulatory region reveals pleiotropy in enhancer  
709 function. *Cell Rep* **22**: 3021–3031.

710 Prieto-Godino LL, Rytz R, Cruchet S, Bargeton B, Abuin L, Silbering AF, Ruta V, Dal  
711 Peraro M, Benton R. 2017. Evolution of acid-sensing olfactory circuits in  
712 *Drosophilids*. *Neuron* **93**: 661-676.e6.

713 Prud'homme B, Gompel N, Carroll SB. 2007. Emerging principles of regulatory evolution.  
714 *Proc Natl Acad Sci* **104**: 8605–8612.

715 Pryke SR. 2010. Sex chromosome linkage of mate preference and color signal maintains  
716 assortative mating between interbreeding finch morphs. *Evolution* **64**: 1301–1310.

717 Ramsay NA, Glover BJ. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of  
718 cellular diversity. *Trends Plant Sci* **10**: 63–70.

719 Ramsey J, Bradshaw HD JR, Schemske DW. 2003. Components of reproductive isolation  
720 between the monkeyflowers *Mimulus lewesii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae).  
721 *Evolution* **57**: 1520–1534.

722 Reed RD, Papa R, Martin A, Hines HM, Counterman BA, Pardo-Diaz C, Jiggins CD,  
723 Chamberlain NL, Kronforst MR, Chen R, et al. 2011. Optix drives the repeated  
724 convergent evolution of butterfly wing pattern mimicry. *Science* **333**: 1137–1141.

725 Riesch R, Muschick M, Lindtke D, Villoutreix R, Comeault AA, Farkas TE, Lucek K, Hellen  
726 E, Soria-Carrasco V, Dennis SR, et al. 2017. Transitions between phases of genomic  
727 differentiation during stick-insect speciation. *Nat Ecol Evol* **1**: 1–13.

728 Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK. 1999. Transgressive segregation, adaptation and  
729 speciation. *Heredity* **83**: 363–372.

730 Rossi M, Hausmann AE, Thurman TJ, Montgomery SH, Papa R, Jiggins CD, McMillan WO,  
731 Merrill RM. 2020. Visual mate preference evolution during butterfly speciation is  
732 linked to neural processing genes. *Nat Commun* **11**: 4763.

733 Sambatti JBM, Strasburg JL, Ortiz-Barrientos D, Baack EJ, Rieseberg LH. 2012. Reconciling  
734 extremely strong barriers with high levels of gene exchange in annual sunflowers.  
735 *Evolution* **66**: 1459–1473.

736 Savolainen O, Lascoux M, Merilä J. 2013. Ecological genomics of local adaptation. *Nat Rev*  
737 *Genet* **14**: 807–820.

738 Schemske DW, Bradshaw HD. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in  
739 monkeyflowers (*Mimulus*). *Proc Natl Acad Sci* **96**: 11910–11915.

740 Schumer M, Xu C, Powell DL, Durvasula A, Skov L, Holland C, Blazier JC, Sankararaman  
741 S, Andolfatto P, Rosenthal GG, et al. 2018. Natural selection interacts with  
742 recombination to shape the evolution of hybrid genomes. *Science* **360**: 656–660.

743 Seehausen O, Terai Y, Magalhaes IS, Carleton KL, Mrosso HDJ, Miyagi R, van der Sluijs I,  
744 Schneider MV, Maan ME, Tachida H, et al. 2008. Speciation through sensory drive in  
745 cichlid fish. *Nature* **455**: 620–626.

746 Seeholzer LF, Seppo M, Stern DL, Ruta V. 2018. Evolution of a central neural circuit  
747 underlies *Drosophila* mate preferences. *Nature* **559**: 564–569.

748 Selby JP, Willis JH. 2018. Major QTL controls adaptation to serpentine soils in *Mimulus*  
749 *guttatus*. *Mol Ecol* **27**: 5073–5087.

750 Servedio MR, Doorn GSV, Kopp M, Frame AM, Nosil P. 2011. Magic traits in speciation:  
751 ‘magic’ but not rare? *Trends Ecol Evol* **26**: 389–397.

752 Shahandeh MP, Turner TL. 2020. The complex genetic architecture of male mate choice  
753 evolution between *Drosophila* species. *Heredity* **124**: 737–750.

754 Sianta SA, Kay KM. 2021. Parallel evolution of phenological isolation across the speciation  
755 continuum in serpentine-adapted annual wildflowers. *Proc R Soc B Biol Sci* **288**:  
756 20203076.

757 Smadja CM, Butlin RK. 2011. A framework for comparing processes of speciation in the  
758 presence of gene flow. *Mol Ecol* **20**: 5123–5140.

759 Smith SD, Pennell MW, Dunn CW, Edwards SV. 2020. Phylogenetics is the new genetics  
760 (for most of biodiversity). *Trends Ecol Evol* **35**: 415–425.

761 Sobel J, Streisfeld M. 2013. Flower color as a model system for studies of plant evo-devo.  
762 *Front Plant Sci* **4**: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00321>.

763 Sobel JM, Chen GF. 2014. Unification of methods for estimating the strength of reproductive  
764 isolation. *Evolution* **68**: 1511–1522.

765 Sorenson MD, Sefc KM, Payne RB. 2003. Speciation by host switch in brood parasitic  
766 indigobirds. *Nature* **424**: 928–931.

767 Stankowski S, Chase MA, McIntosh H, Streisfeld MA. 2023. Integrating top-down and  
768 bottom-up approaches to understand the genetic architecture of speciation across a  
769 monkeyflower hybrid zone. *Mol Ecol in press*: 10.1111/mec.16849.

770 Stankowski S, Streisfeld MA. 2015. Introgressive hybridization facilitates adaptive  
771 divergence in a recent radiation of monkeyflowers. *Proc Biol Sci* **282**: 20151666.

772 Stern DL, Orgogozo V. 2008. The loci of evolution: how predictable is genetic evolution?  
773 *Evol Int J Org Evol* **62**: 2155–2177.

774 Stinchcombe JR, Hoekstra HE. 2008. Combining population genomics and quantitative  
775 genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity* **100**:

776 158–170.

777 Stracke R, Werber M, Weisshaar B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis*  
778 *thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 447–456.

779 Streisfeld MA, Kohn JR. 2007. Environment and pollinator-mediated selection on parapatric  
780 floral races of *Mimulus aurantiacus*. *J Evol Biol* **20**: 122–132.

781 Streisfeld MA, Rausher MD. 2011. Population genetics, pleiotropy, and the preferential  
782 fixation of mutations during adaptive evolution. *Evolution* **65**: 629–642.

783 Sundqvist L, Keenan K, Zackrisson M, Prodöhl P, Kleinhans D. 2016. Directional genetic  
784 differentiation and relative migration. *Ecol Evol* **6**: 3461–3475.

785 The Heliconius Genome Consortium, Dasmahapatra KK, Walters JR, Briscoe AD, Davey  
786 JW, Whibley A, Nadeau NJ, Zimin AV, Hughes DST, Ferguson LC, et al. 2012.  
787 Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among  
788 species. *Nature* **487**: 94–98.

789 Turbek SP, Browne M, Di Giacomo AS, Kopuchian C, Hochachka WM, Estalles C, Lijtmaer  
790 DA, Tubaro PL, Silveira LF, Lovette IJ, et al. 2021. Rapid speciation via the  
791 evolution of pre-mating isolation in the Iberá seedeater. *Science* **371**: eabc0256.

792 Unbehend M, Kozak GM, Koutroumpa F, Coates BS, Dekker T, Groot AT, Heckel DG,  
793 Dopman EB. 2021. Bric à brac controls sex pheromone choice by male European corn  
794 borer moths. *Nat Commun* **12**: 2818.

795 Vijay N, Bossu CM, Poelstra JW, Weissensteiner MH, Suh A, Kryukov AP, Wolf JBW.  
796 2016. Evolution of heterogeneous genome differentiation across multiple contact  
797 zones in a crow species complex. *Nat Commun* **7**: 13195.

798 Wellenreuther M, Bernatchez L. 2018. Eco-evolutionary genomics of chromosomal  
799 inversions. *Trends Ecol Evol* **33**: 427–440.

800 Wessinger CA, Hileman LC. 2020. Parallelism in flower evolution and development. *Annu*  
801 *Rev Ecol Evol Syst* **51**: 387–408.

802 Westram AM, Rafajlović M, Chaube P, Faria R, Larsson T, Panova M, Ravinet M, Blomberg  
803 A, Mehlig B, Johannesson K, et al. 2018. Clines on the seashore: the genomic  
804 architecture underlying rapid divergence in the face of gene flow. *Evol Lett* **2**: 297–  
805 309.

806 Westram AM, Stankowski S, Surendranadh P, Barton N. 2022. What is reproductive  
807 isolation? *J Evol Biol* **35**: 1143–1164.

808 Widmer A, Lexer C, Cozzolino S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants.  
809 *Heredity* **102**: 31–38.

810 Wiley C, Ellison CK, Shaw KL. 2011. Widespread genetic linkage of mating signals and  
811 preferences in the Hawaiian cricket *Laupala*. *Proc R Soc B Biol Sci* **38**:  
812 rspb20111740-102.

813 Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant*  
814 *Biol* **5**: 218–223.

815 Xu M, Shaw KL. 2019. Genetic coupling of signal and preference facilitates sexual isolation  
816 during rapid speciation. *Proc R Soc B Biol Sci* **286**: 20191607.

817 Yang Y, Servedio MR, Richards-Zawacki CL. 2019. Imprinting sets the stage for speciation.  
818 *Nature* **574**: 99–102.

819 Yeaman S, Whitlock MC. 2011. The genetic architecture of adaptation under migration–  
820 selection balance. *Evolution* **65**: 1897–1911.

821 Yoder JB, Gomez G, Carlson CJ. 2020. Zygomorphic flowers have fewer potential pollinator  
822 species. *Biol Lett* **16**: 20200307.

823 Yuan Y-W, Sagawa JM, Young RC, Christensen BJ, Bradshaw HD Jr. 2013. Genetic

824 dissection of a major anthocyanin QTL contributing to pollinator-mediated  
 825 reproductive isolation between sister species of *Mimulus*. *Genetics* **194**: 255–263.  
 826 Zhao Z, McBride CS. 2020. Evolution of olfactory circuits in insects. *J Comp Physiol A* **206**:  
 827 353–367.

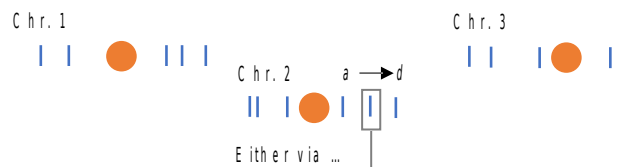
828  
 829

830 **Glossary**

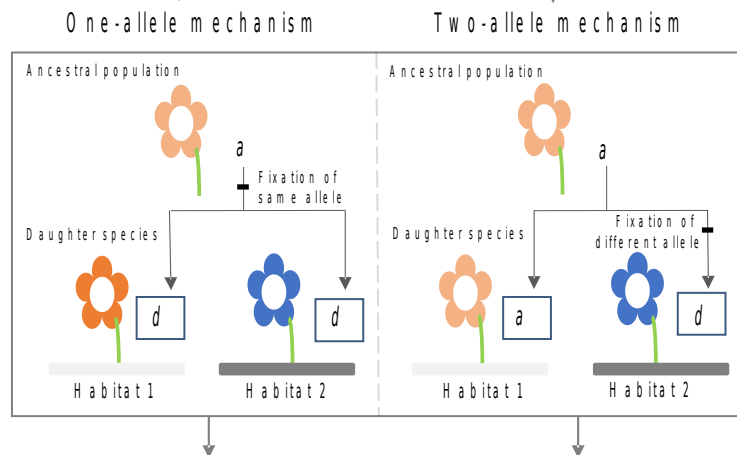
Prezygotic isolation	Reproductive isolating barriers that act before fertilization occurs.
Genetic architecture	For a given phenotype, the number, location, interactions, mode of action, and effect size of underlying genetic loci.
Linkage disequilibrium (LD)	The non-random association of alleles at different loci (regardless of physical proximity).
(Physical) linkage	Physical proximity of loci on a chromosome.
Pleiotropy	A phenomenon in which one allele affects multiple phenotypes.
One-allele mechanism	Where reproductive isolation is strengthened by substituting the <i>same</i> allele in two diverging populations.
Two-allele mechanism	Where reproductive isolation is strengthened by substituting a <i>different</i> allele in two diverging populations.
Magic trait models	Models of speciation that invoke a trait under divergent selection that also contributes to assortative mating.
Phenotype matching rule	Where individuals mate with like individuals on the basis of the presence of traits that they have in common.
Trait-preference (non-matching) rule	Where coordinated divergence in both male and female traits is necessary for assortative mating.

831  
 832  
 833

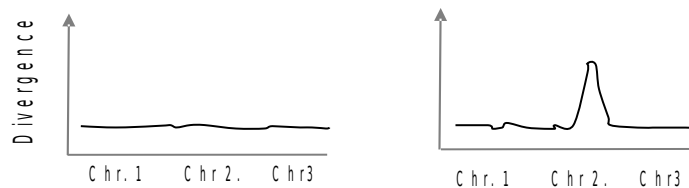
**A** Multiple loci can influence prezygotic barriers.



**B** At each locus, RI must evolve by the substitution of the same (one-allele) or different (two-allele) mutations in the two daughter species.



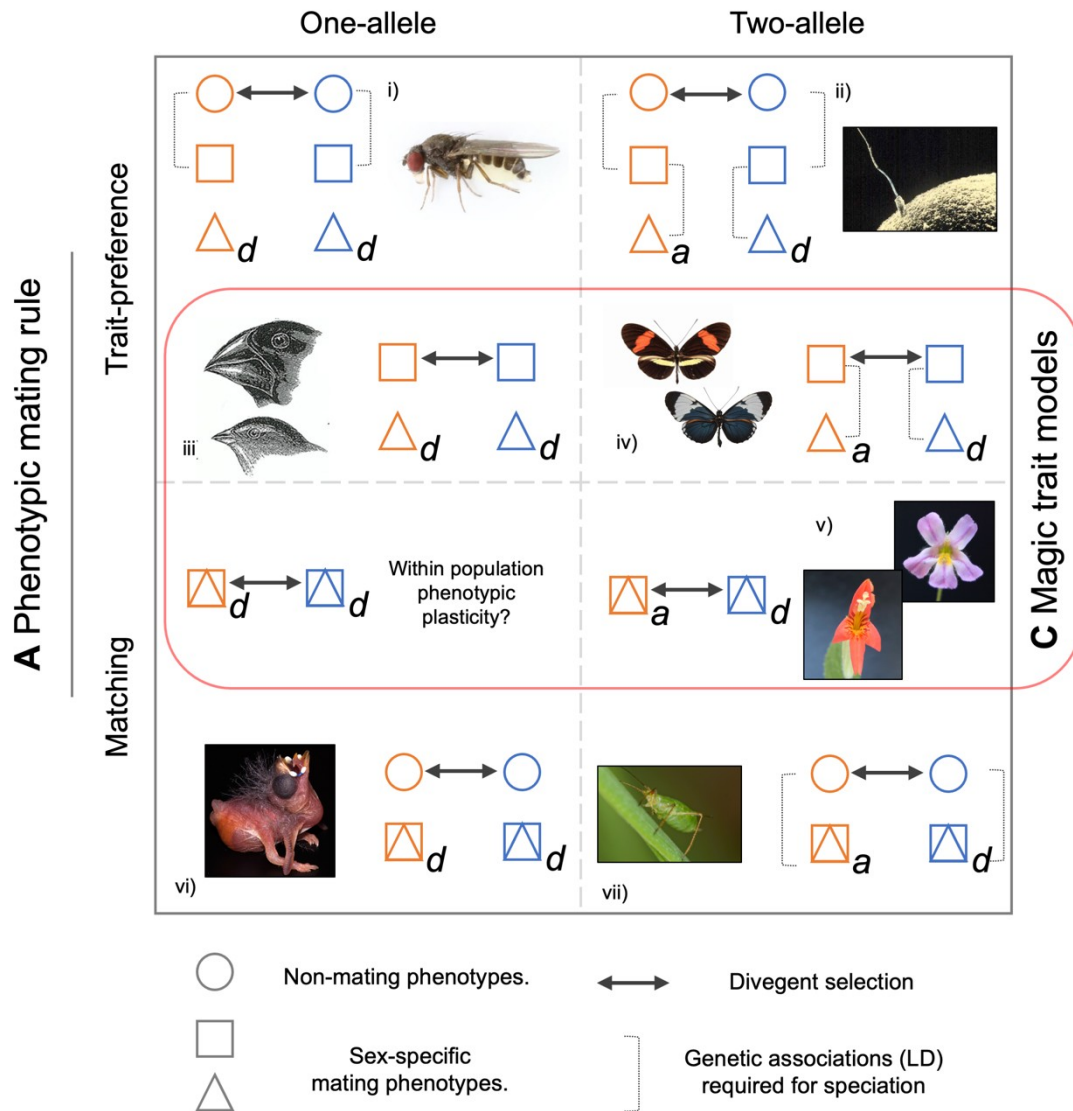
**C** One-allele type variation will be difficult to detect because there is no genetic variation between daughter species at these loci.



834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857

**Figure 1. A.** Substitutions at multiple loci (which may influence multiple phenotypic traits) can strengthen prezygotic isolation. At each locus, the ancestral allele can be replaced by the substitution of a derived allele. **B.** At each individual locus, prezygotic isolation *must* evolve by either the substitution of the same allele ('one-allele mechanism') or different alleles ('two-allele mechanism'). In the *hypothetical* example shown here, alleles at a locus on chromosome 2 influence flower color and cause divergence in the two daughter species, thereby strengthening assortative mating. This can be achieved through the substitution of the same derived alleles (perhaps through the evolution of habitat-induced phenotypic plasticity), or through the fixation of the derived allele in both populations. One-allele mechanisms are expected to greatly facilitate the evolution of prezygotic isolation, because there is no requirement for LD with other components (such as local adaptation). One- and two-allele mechanisms are not mutually exclusive, and both types of variation can contribute to prezygotic barriers, or even the same phenotypes. **C.** Although allelic variation of the one-allele type is often harder to comprehend, examples are potentially widespread and could include alleles for increased choosiness, reduced migration, stronger imprinting or decreased variance in flowering time, among others. Nevertheless, our ability to detect this type of genetic variation may be limited because of the typical focus on characterizing differences between species (including QTL, GWAS, 'genome scans' analyses etc.). As a result, although one-allele mechanisms are broadly accepted as the easiest route to strengthen prezygotic isolation in the face of gene flow, strong empirical evidence remains limited.

## B Type of genetic variation



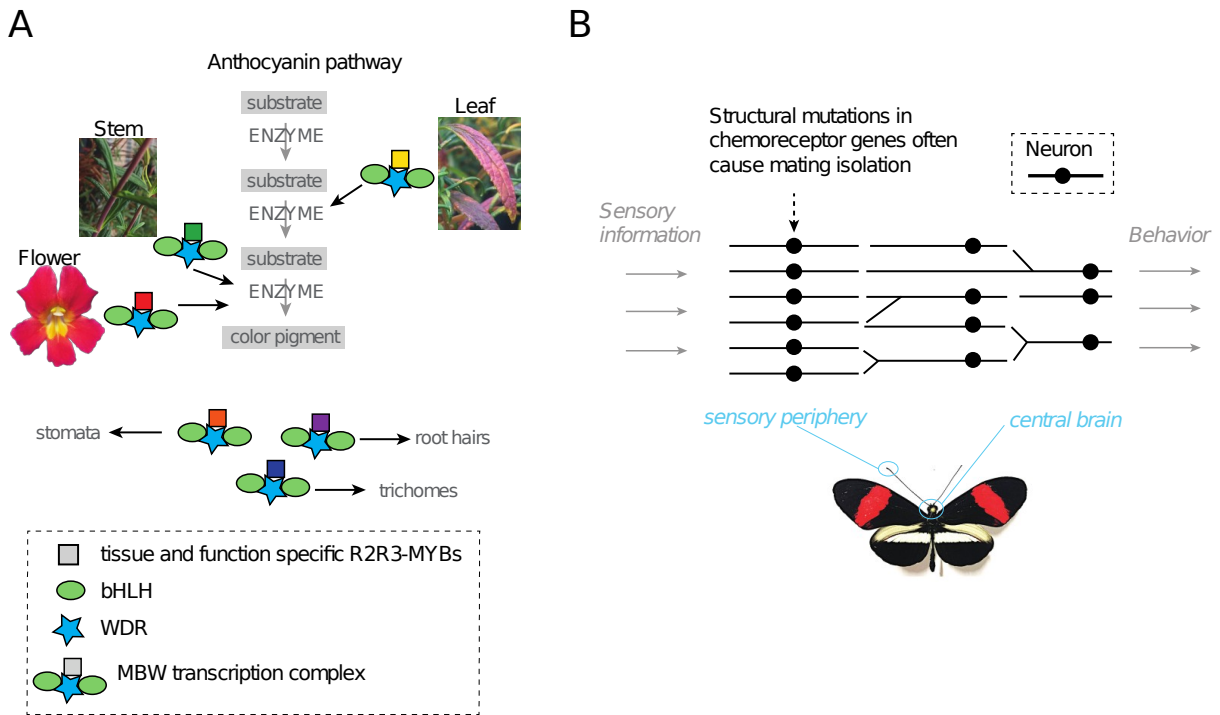
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875

**Figure 2.** Three broad classes of conceptual models have been proposed that reduce the number of genetic associations (LD) that must be maintained for prezygotic isolation to evolve in the face of gene flow. These models include: **A.** Phenotype matching, where assortative mating depends on the presence of traits that both sexes have in common (Kopp et al. 2018); **B.** One-allele mechanisms, where prezygotic isolation is strengthened by the substitution of the same allele in the two nascent species (Felsenstein 1981; Figure 1); and **C.** Magic trait models, which assume that a trait under divergent selection also contributes to assortative mating (Gavrilets 2004). These scenarios are not mutually exclusive and may simultaneously contribute to the evolution of prezygotic isolation during a single speciation event. Shapes represent different phenotypes involved, where circles are traits not directly related to mating (on which divergent selection, depicted by arrows, may act), and squares and triangles represent sex-specific mating traits (which may be one and the same in matching scenarios). Brackets represent genetic associations (LD) that must be maintained for prezygotic isolation to evolve when gene flow persists. We assume that allelic substitutions (*a* for ancestral or *d* for derived) evolving under a one- or two-allele mechanism influence one of the sex-specific phenotypes, but they might equally influence all components of prezygotic isolation (i.e.



876 here: squares, triangles and circles). Examples are provided for illustration: i) The same  
877 allele has experimentally been shown to strengthen female preference for conspecific  
878 males in the sister species *Drosophila subobscura* and *D. persimulans* (Ortíz-Barrientos  
879 and Noor 2005)(Photo: D. Obbard); ii) Interactions between sperm and egg that  
880 contribute to prezygotic postmating isolation might *conceivably* represent a trait-  
881 preference scenario, but are unlikely to be under direct divergent selection themselves  
882 (Photo: Unknown via Wikimedia Commons; iii) Divergent selection acting on beak  
883 morphology influences song in Darwin's finches (Podos 2001), which is learned by  
884 females. *Conceivably*, alleles that increase learning ability could spread in both species,  
885 thereby strengthening reproductive isolation (Picture: Kammster via Wikimedia  
886 Commons); iv) In *Heliconius cydno* and *H. melpomene*, different alleles determine  
887 divergent visual mating preferences for bright warning patterns, which are under  
888 divergent selection. In this case, tight linkage between wing pattern and preference  
889 alleles is known to help maintain LD (Merrill et al. 2019) (Photo: G. Gallice Via Wikimedia  
890 Commons); v) Flower color (controlled by different alleles) is under divergent selection by  
891 local pollinators, which simultaneously contributes to assortative mating (Schemske and  
892 Bradshaw 1999) (Photo: KK); vi) Different species of brood parasitic *Vidua* finches have  
893 evolved a number of adaptations, such as gape colouration, allowing them to parasitise  
894 nests of different host species. Both male and female chicks learn the song of their foster  
895 parents, which then contributes to assortative mating (Sorenson et al. 2003).  
896 *Conceivably*, the same allele could spread through different species to strengthen the  
897 ability to learn, or the strength of preference for different hosts (Photo from Jamie et al.  
898 2020); vi) Pea aphids have adapted to different host plants, on which they mate. LD  
899 between alleles for performance and preference are maintained by physical linkage  
900 (Hawthorne and Via 2001)(Photo: A. Murray via Wikimedia Commons).

901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913



914

915 **Figure 3. A.** In plants, evolutionary transitions in flower color are readily caused by  
 916 mutations in genes encoding R2R3-MYB transcription factors. These R2R3-MYB proteins  
 917 combine with a WD-repeat protein (WDR) and at least two basic helix-loop-helix (bHLH)  
 918 proteins to form multi-protein transcription complexes (commonly referred to as MBWs).  
 919 MBWs regulate multiple genes determining epidermal cell fate throughout the plant,  
 920 including those genes encoding enzymes that function in the biochemical steps of  
 921 anthocyanin pigment synthesis. There are multiple R2R3-MYB copies throughout a plant  
 922 genome, which allows MBW transcription complexes to be tissue- and function-specific  
 923 and limits deleterious pleiotropic effects of R2R3-MYB mutations. For example, in this  
 924 hypothetical cartoon example, three different MBW transcription complexes regulate  
 925 anthocyanin pigments in flowers, leaves and stems, and the R2R3-MYBs are shaded with  
 926 different colors to indicate specificity in the part of the pathway and/or the plant tissue  
 927 targeted. Other MBW transcription complexes, here with colors indicating different R2R3-  
 928 MYBs, can regulate pathways that produce trichomes (plant hairs), root hairs, and  
 929 stomata. Thus, mutations that change flower color can have limited effects on the rest of  
 930 the plant, even if they use a common mechanism of gene regulation. **B.** Similarly, in  
 931 animals, differences in the extent of pleiotropy are thought to affect which mutations  
 932 impact mating isolation. In insects, mutations in chemoreceptors at the sensory  
 933 periphery of neural systems might be more often responsible for mating isolation than  
 934 mutations affecting the central parts of the brain. In this schematic of a neural network,  
 935 the general direction of information is from left to right, with circles indicating neuronal  
 936 bodies and lines indicating their connections. Neurons tend to be more interconnected  
 937 and conduct higher-level computations going from the sensory periphery to the central  
 938 brain (Photos by MR and MS).

939

940

941

942

943

944

## Supplementary Materials – Spanish Version

945

### 946 **Resumen**

947 La importancia del aislamiento precigótico para la especiación se ha reconocido al menos  
948 desde la Síntesis Moderna, sin embargo, varias preguntas fundamentales siguen abiertas. Por  
949 ejemplo, ¿cómo se mantienen las asociaciones genéticas entre rasgos que contribuyen al  
950 aislamiento precigótico? ¿Cuál es la fuente de variación genética subyacente a la evolución  
951 de estos rasgos? ¿Y cómo las barreras precigóticas afectan los patrones de flujo genético?  
952 Para abordar estas preguntas, revisamos características genéticas compartidas por plantas y  
953 animales que influyen en el aislamiento precigótico. Las tecnologías emergentes hacen  
954 posible cada vez más la identificación y caracterización funcional de los genes implicados,  
955 permitiéndonos poner a prueba expectativas teóricas reconocidas. La consideración del  
956 contexto de desarrollo de estos genes permitirá realizar nuevas predicciones sobre los factores  
957 que limitan la evolución del aislamiento precigótico. Las mejoras en curso de herramientas  
958 estadísticas y computacionales revelarán cómo el aislamiento precigótico y poscigótico  
959 pueden diferir en la forma en que influyen en el flujo genético a lo largo del genoma. Por  
960 último, destacamos las oportunidades de avanzar combinando la teoría con datos apropiados.

961

### 962 **Introducción**

963 El aislamiento precigótico incluye todas las barreras al flujo genético entre poblaciones que  
964 ocurren antes de la fertilización. Al actuar en una fase temprana del ciclo de vida, se espera  
965 que las barreras precigóticas tengan un efecto desproporcionado sobre el aislamiento  
966 reproductivo (AR) total, ya que tienen el potencial de limitar el flujo genético antes de que  
967 otras barreras puedan actuar (Coyne y Orr 2004; Ramsey et al. 2003). Un objetivo clave de la  
968 genética evolutiva es comprender los mecanismos históricos, de desarrollo y ecológicos que  
969 generan divergencia adaptativa y aislamiento reproductivo. Sin embargo, un obstáculo  
970 importante que limita nuestra comprensión del aislamiento precigótico es que este suele  
971 afectar una variedad de fenotipos, como la fisiología, color, morfología y comportamiento.  
972 Además, los tipos de rasgos que contribuyen al aislamiento precigótico pueden variar entre

973 organismos, lo que ha conducido a una falta de comunicación entre los científicos que  
974 trabajan con distintos sistemas de estudio.

975         En este capítulo ofrecemos un repaso general de las características comunes a  
976 distintos organismos que pueden limitar o facilitar la evolución del aislamiento precigótico.  
977 Comenzamos con el problema clásico del antagonismo selección-recombinación, cómo  
978 pueden superarlo los distintos tipos de variación alélica y arquitectura genética, y las  
979 contribuciones de investigaciones recientes en este ámbito. Luego nos centramos en  
980 consideraciones próximas, como los orígenes de variación genética y cómo su contexto de  
981 desarrollo puede limitar la evolución del aislamiento precigótico. Por último, examinamos  
982 cómo las barreras precigóticas afectan al flujo genético y nos preguntamos cómo podemos  
983 distinguir sus efectos de los del aislamiento poscigótico. Concluimos con las oportunidades  
984 que vemos para realizar avances significativos.

985

### 986 **La recombinación como un limitante clave de la evolución de aislamiento precigótico.**

987 En la actualidad existe una gran cantidad de trabajos teóricos sobre la evolución del  
988 aislamiento precigótico (ver las excelentes revisiones de Kirkpatrick y Ravigné 2002 y Kopp  
989 et al. 2018). Aunque el aislamiento precigótico puede evolucionar en alopatría (Knowlton et  
990 al. 1993; Langerhans et al. 2007), la mayoría de los modelos consideran cómo la especiación  
991 puede proceder cuando las poblaciones continúan intercambiando alelos (ya sea bajo  
992 simpatría completa, parapatría o después de un contacto secundario). Esto no se debe a que la  
993 alopatría sea insignificante; si se da el tiempo suficiente, los rasgos divergirán hasta el punto  
994 en que las poblaciones ya no podrían entrecruzarse si sus áreas de distribución vuelven a  
995 solaparse. Sin embargo, como famosamente lo señaló Felsenstein (1981), cuando las  
996 poblaciones permanecen en contacto, la evolución del aislamiento precigótico se enfrenta a  
997 una limitante genética más fundamental. Se trata de la "recombinación, que actúa para  
998 aleatorizar la asociación entre el mecanismo de aislamiento precigótico (apareamiento  
999 asortativo) y las adaptaciones a los dos entornos" (Felsenstein 1981).

1000         A pesar del escepticismo de Felsenstein, cada vez es más claro que la especiación  
1001 puede producirse a pesar del flujo genético (Arnold 2015; Abbott et al. 2013; Pinho y Hey  
1002 2010). Al mismo tiempo, se ha renovado la apreciación del papel de la selección natural  
1003 divergente en la promoción de divergencia poblacional (Nosil 2012). Estas observaciones  
1004 están relacionadas porque la teoría predice que la especiación con flujo genético normalmente

1005 requiere tanto la evolución del apareamiento asortativo como la divergencia en rasgos  
1006 ecológicos (Kopp et al. 2018). Aunque existen modelos de especiación con flujo génico  
1007 "libres de ecología" (por ejemplo, Higashi et al. 1999), los supuestos son muy restrictivos.  
1008 Además, la especiación con flujo genético que depende únicamente de la selección sexual  
1009 puede considerarse poco realista (Kopp et al. 2018; pero ver Yang et al. 2019 para un ejemplo  
1010 de un mecanismo potencialmente extendido en el que la impronta sexual también causa  
1011 selección divergente). Por último, la especiación con flujo genético también requiere,  
1012 normalmente, el mantenimiento de asociaciones genéticas (es decir, desequilibrio de  
1013 ligamiento, DL) entre los alelos que contribuyen al apareamiento asortativo y aquellos bajo  
1014 selección divergente. Tomados juntos, estos requisitos plantean un reto conceptual que  
1015 perdura: si las poblaciones siguen cruzándose, la recombinación rompería el DL entre los  
1016 alelos de los rasgos que causan el apareamiento asortativo y el de los rasgos que están bajo  
1017 selección divergente ("antagonismo selección-recombinación") (Felsenstein 1981). En otras  
1018 palabras, el flujo genético impediría la evolución de las barreras reproductivas precigóticas  
1019 que mantienen separadas a las poblaciones. El número y la distribución de los loci barrera (es  
1020 decir, los loci que causan AR), y la naturaleza de los alelos en estos loci pueden influir  
1021 profundamente en la evolución del aislamiento precigótico (Smadja y Butlin 2011).

1022

### 1023 **¿Cuántos loci contribuyen al aislamiento precigótico?**

1024 Una pregunta fundamental que podemos hacernos sobre el aislamiento precigótico es:  
1025 ¿cuántos loci contribuyen a su evolución? Se espera que arquitecturas genéticas con menos  
1026 loci de gran efecto sean más resistentes a los efectos homogeneizadores del flujo genético que  
1027 las arquitecturas altamente poligénicas, en las que los loci tienen efectos pequeños  
1028 individualmente y están distribuidos ampliamente por el genoma. Esto se debe a que menos  
1029 loci ofrecen menos blancos para la recombinación, y la selección (correlacional) se concentra  
1030 en menos blancos (Gavrilets 2004; Gavrilets y Vose 2007; Yeaman y Whitlock 2011).

1031 El mapeo de locus de rasgo cuantitativo (QTL por su sigla en inglés) es una de las  
1032 principales herramientas utilizadas para identificar loci que contribuyen al AR y ha mejorado  
1033 nuestra comprensión del aislamiento precigótico (revisado en Arbuthnott 2009; Widmer et al.  
1034 2009). Sin embargo, el mapeo de QTL tiene una serie de limitaciones bien conocidas.  
1035 Aunque la generación de marcadores genéticos es relativamente sencilla ahora, el gran  
1036 número de descendientes fenotipados necesarios para detectar QTL de forma robusta es a

1037 menudo difícil, limitando nuestra capacidad para detectar los QTL de efecto más pequeño y  
1038 dando lugar a sobreestimaciones de los tamaños de efecto (Beavis et al. 1994). Los QTL  
1039 resultantes pueden contener cientos de genes, lo que limita nuestra capacidad para estimar el  
1040 número de mutaciones subyacentes a los rasgos o para distinguir la pleiotropía del ligamiento  
1041 (Shahandeh y Turner 2020). Además, los estudios en los que no se identifican QTL pueden  
1042 permanecer sin publicar, lo que conduce a una visión sesgada de los tamaños de efecto.

1043       Parece haber variación en el número y tamaño de los efectos de los loci que  
1044 contribuyen al aislamiento precigótico tanto en plantas como en animales, sin embargo, los  
1045 estudios de QTL son difíciles de comparar directamente debido a las diferencias en  
1046 metodología, tamaño de las muestras y tipos de rasgos medidos. Las señales y preferencias de  
1047 apareamiento en animales pueden ser poligénicas (Chenoweth y Blows 2006; Chenoweth y  
1048 McGuigan 2010), pero también hay pruebas de loci de gran efecto (Merrill et al. 2019; Xu y  
1049 Shaw 2019). Del mismo modo, en plantas con flores, el aislamiento floral a menudo implica  
1050 una mezcla de loci de gran efecto que controlan el color y olor con numerosos loci de efecto  
1051 pequeño que controlan la morfología (Wessinger y Hileman 2020; Kay y Surget-Groba 2022;  
1052 Klahre et al. 2011; Yuan et al. 2013). Es probable que la divergencia en la afinidad del hábitat  
1053 que contribuye al aislamiento ecogeográfico o a la inviabilidad de los inmigrantes sea  
1054 altamente poligénica debido a los fenotipos multivariados implicados (Savolainen et al. 2013;  
1055 Barghi et al. 2020), pero también se han identificado loci de gran efecto en algunos casos (por  
1056 ejemplo, Selby y Willis 2018; Colosimo et al. 2005).

1057       Aunque los estudios de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en  
1058 inglés) y el mapeo de mezcla pueden proporcionar una gran resolución, también pueden  
1059 adolecer de falta de potencia y depender de la disponibilidad de variación natural. En los  
1060 casos que sea factible, combinar el mapeo con pruebas funcionales y enfoques genómicos  
1061 poblacionales puede proporcionar la mejor oportunidad para comprender la arquitectura  
1062 genética del aislamiento precigótico (Stinchcombe y Hoekstra 2008; Bomblies y Peichel  
1063 2022). Los enfoques filogenómicos comparativos también pueden proporcionar una  
1064 herramienta útil para comprender las barreras precigóticas que han evolucionado  
1065 repetidamente dentro de un clado (Smith et al. 2020).

1066

1067 **¿Qué tipo de variación alélica contribuye al aislamiento precigótico?**

1068           Una segunda contribución clave de Felsenstein (1981) fue la observación de que,  
1069 independientemente del número total de loci o de los rasgos o taxones implicados, el  
1070 aislamiento precigótico *debe* evolucionar en loci genéticos individuales mediante un  
1071 mecanismo de "un alelo" o de "dos alelos" (Felsenstein 1981; Figura 1). Como se ha señalado  
1072 antes (Kopp et al. 2018; Butlin et al. 2021), estos términos a menudo no se entienden bien,  
1073 pero "la distinción crítica . . . es si el aislamiento reproductivo se fortalece mediante la  
1074 sustitución de *alelos iguales* o *diferentes* en las dos especies nacies" (Felsenstein 1981).  
1075 Estos dos mecanismos no tienen por qué actuar de forma aislada, y la variación en diferentes  
1076 componentes del aislamiento precigótico, o incluso en rasgos individuales, puede implicar  
1077 tanto escenarios de uno como de dos alelos. Sin embargo, la distinción tiene implicaciones  
1078 importantes para la evolución del aislamiento precigótico con flujo genético, porque cuando  
1079 el mismo alelo fortalece el aislamiento precigótico en ambas poblaciones divergentes  
1080 (mecanismo de un alelo), se evita el requisito de DL entre los loci bajo selección divergente y  
1081 los que aumentan el apareamiento asortativo. Dado que tales alelos fortalecerían el AR  
1082 incluso si recombinan en la otra población, el flujo genético no supone ningún obstáculo para  
1083 la sustitución de alelos que aumentan el aislamiento.

1084           Los mecanismos de un alelo son ampliamente aceptados como la vía más fácil para  
1085 fortalecer el aislamiento precigótico frente al flujo genético (Butlin et al. 2021). Los ejemplos  
1086 son potencialmente extendidos y podrían incluir alelos para una mayor selectividad en la  
1087 elección de pareja, migración disminuida, impronta más fuerte o menor varianza en el tiempo  
1088 de floración. Sin embargo, la evidencia empírica actual de un mecanismo explícito de un  
1089 alelo de aislamiento precigótico se limita a un único experimento en moscas. Ortiz-Barrientos  
1090 y Noor (2005) mapearon primero la variación intraespecífica en la discriminación de  
1091 apareamiento de las hembras entre poblaciones de *Drosophila pseudoobscura*, que son  
1092 simpátricas o alopátricas con respecto a la especie hermana *D. persimilis*. A continuación,  
1093 probaron la existencia de un mecanismo de apareamiento asortativo de un alelo mediante la  
1094 introgresión de alelos de discriminación fuerte (simpátrico) o de discriminación débil  
1095 (alopátrico) de *D. pseudoobscura* en *D. persimilis*. Las hembras de *D. persimilis* con los  
1096 alelos de discriminación fuerte de *D. pseudoobscura* fueron mucho menos propensas a  
1097 aparearse con machos heteroespecíficos que aquellas con alelos de discriminación débil de *D.*  
1098 *pseudoobscura*, lo que demuestra directamente que los mismos alelos simpátricos podrían  
1099 aumentar el aislamiento precigótico tanto en *D. pseudoobscura* como en *D. persimilis* (pero

1100 ver Barnwell y Noor 2008 para un intento fallido de replicación). Estos experimentos ponen  
1101 de manifiesto la dificultad de probar mecanismos de un alelo, especialmente porque se basan  
1102 en poblaciones ancestrales indirectas, en este caso la *D. pseudoobscura* alopátrica, de  
1103 organismos experimentalmente manejables.

1104 Dado que los mecanismos de un alelo pasarían desapercibidos en los enfoques típicos  
1105 que investigan las diferencias entre taxones divergentes, comprender estos mecanismos  
1106 plantea un reto empírico significativo y representa un vacío importante en el estudio de la  
1107 genética de la especiación. Sugerimos el uso de grupos externos apropiados para identificar  
1108 rasgos derivados y alelos compartidos entre el grupo interno que aumenten consistentemente  
1109 el apareamiento asortativo. Este enfoque requiere una comprensión detallada de cómo los  
1110 rasgos afectan los patrones de apareamiento, ya que los enfoques que no tienen en cuenta el  
1111 fenotipo, como los escaneos genómicos, pasarían por alto estos mecanismos. Es posible que  
1112 los rasgos que actualmente se caracterizan como innovaciones clave que aumentan las tasas  
1113 de especiación dentro de los clados sean esencialmente mecanismos de un alelo. Por ejemplo,  
1114 la simetría floral bilateral se asocia con una polinización más especializada y mayores tasas  
1115 de diversificación (Kay et al. 2006; Yoder et al. 2020). Los estudios genéticos a través de  
1116 transiciones independientes de simetría floral radial a bilateral han mostrado cambios  
1117 regulatorios similares que afectan a genes parecidos a *CYCLOIDEA* (revisado en Hileman  
1118 2014), que pueden funcionar como mecanismos de un alelo fortaleciendo el aislamiento  
1119 reproductivo entre taxa en estos clados. Esta hipótesis podría comprobarse mediante  
1120 manipulaciones similares a las de Ortiz-Barrientos y Noor (2005) descritas anteriormente (o  
1121 indirectamente mediante manipulación fenotípica).

1122

### 1123 **¿Cómo se mantienen las asociaciones genéticas entre los componentes del aislamiento** 1124 **precigótico?**

1125 Cuando el aislamiento precigótico evoluciona mediante la sustitución de alelos diferentes en  
1126 poblaciones divergentes (mecanismo de *dos alelos*), debe mantenerse el DL entre los alelos  
1127 sujetos a selección divergente y los que subyacen a los componentes del apareamiento  
1128 asortativo. Una forma de conseguirlo es que los mismos rasgos sometidos a selección  
1129 divergente contribuyan también al apareamiento asortativo. Aunque tales escenarios se  
1130 consideraban improbables (y por ello se denominaban "modelos de rasgos mágicos"  
1131 (Gavrilets 2004)), ahora es evidente que los rasgos de apareamiento asortativo están



1132 frecuentemente bajo selección divergente (Servedio et al. 2011). Por ejemplo, los patrones  
1133 brillantes de las alas de las mariposas *Heliconius* contribuyen al aislamiento ecológico  
1134 poscigótico, porque los híbridos con patrones de advertencia intermedios no son reconocidos  
1135 como desagradables, pero también actúan como señales durante la elección de pareja (Jiggins  
1136 et al. 2001; Merrill et al. 2012). Del mismo modo, en los peces cíclidos, se ha hipotetizado de  
1137 que la adaptación del sistema sensorial visual a entornos locales contribuye a preferencias de  
1138 pareja divergentes (Seehausen et al. 2008; Maan et al. 2017). El aislamiento floral también  
1139 encajaría a menudo en un modelo de rasgo mágico, ya que la adaptación divergente a  
1140 polinizadores locales contribuiría de forma natural al apareamiento asortativo. Por ejemplo, el  
1141 color de las flores de la flor mono (*monkeyflowers* en inglés) es objeto de selección divergente  
1142 por parte de los polinizadores locales, lo que contribuye simultáneamente al apareamiento  
1143 asortativo (Schemske y Bradshaw 1999; Streisfeld y Kohn 2007).

1144 Las asociaciones entre los rasgos implicados en el aislamiento precigótico y aquellos  
1145 bajo selección divergente también pueden mantenerse a través de arquitecturas genéticas que  
1146 reducen la recombinación, como el ligamiento genético estrecho, inversiones o pleiotropía  
1147 (Felsenstein 1981; Wellenreuther y Bernatchez 2018; Huang y Rieseberg 2020; Maynard  
1148 Smith 1966; Smadja y Butlin 2011). Existen pruebas de este tipo de arquitecturas genéticas,  
1149 en gran medida reveladas por estudios de mapeo de QTL. Por ejemplo, Hawthorne y Via  
1150 (2001) identificaron loci para la preferencia de hospedero y el desempeño en los pulgones del  
1151 guisante que se colocaron en las mismas regiones del genoma. Estos insectos se aparean  
1152 en su hospedero, lo que proporciona una vía rápida para la especiación. Desde entonces, otros  
1153 han reportado evidencia de ligamiento físico entre los loci que subyacen al apareamiento  
1154 asortativo y los rasgos ecológicos, incluso en flores mono (Ferris et al. 2017; Lowry y Willis  
1155 2010) y mariposas *Heliconius* (Merrill et al. 2019). Una pregunta que perdura es si el  
1156 ligamiento físico típicamente facilita la sustitución de alelos coadaptados o si los  
1157 reordenamientos estructurales o los supresores de recombinación típicamente aumentan el  
1158 ligamiento después de las sustituciones alélicas (Charlesworth y Charlesworth 1979;  
1159 Kirkpatrick y Barton 2006). Un enfoque para abordar esto podría ser examinar loci  
1160 homólogos en un grupo externo. Por ejemplo, Hermann et al. (2013) hallaron cinco loci  
1161 estrechamente vinculados que controlan las diferencias en el color, el aroma y la morfología  
1162 de las flores en especies de *Petunia* adaptadas a polinización por colibrí frente a la  
1163 polinización por polilla. Al examinar la ubicación de estos loci en parientes más lejanos,

1164 mostraron que el ligamiento es exclusivo de *Petunia*, lo que sugiere que los reordenamientos  
1165 estructurales pueden haber atado estos alelos coadaptados (Hermann et al. 2013), aunque esto  
1166 debe ser confirmado por estudios de sintenia con grupos externos más cercanos.

1167         A nivel fenotípico, el apareamiento asortativo puede caracterizarse además por seguir  
1168 reglas de "preferencia de rasgos", en las que la divergencia coordinada entre los rasgos  
1169 masculinos y femeninos es necesaria para el apareamiento asortativo, o "reglas de  
1170 concordancia (*matching rules* en inglés)", en las que los individuos se aparean con individuos  
1171 similares basados en rasgos compartidos (Kopp et al. 2018). Esto tiene consecuencias  
1172 genéticas: mientras que es probable que los distintos rasgos masculinos y femeninos estén  
1173 controlados por loci diferentes, la concordancia de fenotipos implicaría loci compartidos. En  
1174 el escenario de preferencia de rasgos, que puede ser una característica común del aislamiento  
1175 comportamental en animales, aumenta el número de asociaciones genéticas entre loci  
1176 necesarias para que evolucione el aislamiento precigótico, lo que impide la especiación  
1177 (Smadja y Butlin 2011). En plantas, las incompatibilidades polen-pistilo pueden ser análogas  
1178 a los sistemas de preferencia de rasgos animales. En estas situaciones, la especiación puede  
1179 verse facilitada por estructuras genéticas, como el ligamiento estrecho o la pleiotropía, que  
1180 reducen la disociación de los rasgos masculinos y femeninos (McNiven y Moehring 2013;  
1181 Pryke 2010; Merrill et al. 2019; Xu y Shaw 2019). El DL entre alelos de rasgo y preferencia  
1182 no ligados surgirá como consecuencia natural del apareamiento no aleatorio (Kirkpatrick  
1183 1982), y si uno de estos componentes está sujeto a selección divergente (un "escenario de  
1184 rasgo mágico"), también ayudará a superar el antagonismo selección-recombinación. Sin  
1185 embargo, la fuerza del DL dependerá del tamaño del efecto de los alelos de 'preferencia', y el  
1186 DL generado en estos escenarios puede no ser robusto a la recombinación sin ligamiento  
1187 físico o pleiotropía (Wiley et al. 2011). Sin embargo, las polillas taladro del maíz (*corn borer*  
1188 *moths* en inglés) proporcionan datos convincentes, donde los alelos para la variación de  
1189 feromona y la preferencia correspondiente se encuentran en loci en cromosomas diferentes,  
1190 pero permanecen en DL fuerte (Unbehend et al. 2021; ver también Hench et al. 2019).

1191         Cuando el apareamiento sigue una regla de concordancia, se requiere DL entre menos  
1192 pares de loci. El color de la flor es un ejemplo probablemente extendido (por ejemplo,  
1193 Schemske y Bradshaw 1999), porque tanto los componentes masculinos como femeninos de  
1194 una flor hermafrodita comparten la misma señal para atraer polinizadores; sin embargo, la  
1195 divergencia en otros rasgos florales también puede contribuir a reglas de concordancia. Por

1196 ejemplo, Kay y Surget-Groba (2022) encontraron QTL para la divergencia en la longitud de  
1197 la flor en dos especies de jengibre espiral estrechamente relacionadas, lo que  
1198 simultáneamente determina si el polen se deposita, y luego recoge, en el pico o en la frente  
1199 del colibrí, su polinizador compartido. Otros ejemplos de reglas de concordancia proceden  
1200 del aislamiento ecológico o de hábitat, en el que individuos con afinidades similares se  
1201 aparean debido a la proximidad espacial y/o al solapamiento fenológico. Un ejemplo clásico  
1202 son los insectos fitófagos que se aparean en su hospedero (Matsubayashi et al. 2010). En  
1203 peces espinosos (*sticklebacks* en inglés) adaptados a hábitats bentónicos y limnéticos dentro  
1204 del mismo lago, Conte y Schluter (2013) revelaron la concordancia de fenotipos mediante la  
1205 manipulación del tamaño corporal. En el mismo sistema, Bay et al. (2017) descubrieron que  
1206 hembras híbridas F2 se apareaban con machos que eran similares en tamaño y forma  
1207 corporal, y los QTL de elección de pareja mapearon a una de las regiones antes mapeadas  
1208 para morfología bentónica frente a la limnética, lo que se explica mejor en un escenario de  
1209 concordancia fenotípica. Dado que el tamaño corporal está bajo selección divergente en estos  
1210 peces, este ejemplo también corresponde a un modelo de rasgo mágico. Además, aunque la  
1211 divergencia en el tamaño corporal implica alelos diferentes (un mecanismo de dos alelos), el  
1212 apareamiento asortativo podría fortalecerse mediante la sustitución del mismo alelo en ambas  
1213 poblaciones (mecanismo de un alelo). Así, los peces espinosos demuestran muy bien cómo  
1214 estos conceptos distintos, que implican reglas de concordancia, rasgos mágicos y mecanismos  
1215 de uno y dos alelos, pueden actuar simultáneamente dentro de un mismo par de taxa (Figura  
1216 2).

1217         A pesar de expectativas teóricas sólidas, distinguir entre los mecanismos genéticos  
1218 que contribuyen al aislamiento precigótico en poblaciones naturales sigue siendo difícil. En la  
1219 mayoría de los casos, será necesario ir más allá de los estudios de mapeo tradicionales para  
1220 incorporar estudios de expresión genética, genómica de poblaciones y genómica funcional.  
1221 Por ejemplo, los estudios de expresión genética en especies de *Heliconius* revelaron genes  
1222 candidatos subyacentes a un QTL de preferencia de apareamiento (Rossi et al. 2020) que  
1223 fueron implicados independientemente como loci barrera mediante métodos de genómica  
1224 poblacional (Laetsch et al. 2022). Estos resultados sugieren que el vínculo estrecho entre  
1225 estos genes candidatos y el gen del patrón de color responsable del mimetismo está  
1226 impulsando este aislamiento, en lugar de la pleiotropía. De forma similar, en flores mono, un  
1227 locus de gran efecto (*YUP*) que controla la deposición de pigmentos (y la presencia o

1228 ausencia de guías de néctar que contribuyen al aislamiento floral) fue mapeado en una región  
1229 genómica que también controla otros rasgos florales y factores de esterilidad masculina en  
1230 híbridos (Bradshaw et al. 1995; Bradshaw y Schemske 2003). *YUP* se resistió a una disección  
1231 genética a mayor escala porque se ubica en una región de recombinación suprimida (Fishman  
1232 et al. 2013). Sin embargo, recientemente, Liang et al. (2023) utilizaron una combinación de  
1233 construcción de líneas casi isogénicas (*NIL construction* en inglés), ARNseq, ARNi,  
1234 transformación, pruebas de complementación, microscopía de fluorescencia confocal y  
1235 genómica comparativa para demostrar que *YUP* produce ARNs pequeños de interferencia  
1236 (Liang et al. 2023). Sin embargo, todas estas aproximaciones dependen de la identificación  
1237 previa de los loci blanco, la capacidad de manipular un gran número de organismos  
1238 experimentales y una comprensión detallada de los fenotipos subyacentes al aislamiento  
1239 precigótico.

1240

### 1241 **¿Cómo la historia evolutiva y el desarrollo limitan la evolución del aislamiento** 1242 **precigótico?**

1243 Una vez identificadas las bases genéticas de los rasgos que contribuyen al aislamiento  
1244 precigótico, un paso siguiente importante es investigar la historia evolutiva de estas variantes,  
1245 lo que puede tener implicaciones significativas para determinar el tempo y el modo de  
1246 especiación. Aunque los modelos clásicos suelen asumir mutaciones *de novo* (revisado en Orr  
1247 2005), ahora está claro que la variación genética preexistente latente puede desempeñar un  
1248 papel importante (Barrett y Schluter 2008). Por ejemplo, las pérdidas repetidas de placas  
1249 laterales en poblaciones de peces espinosos de agua dulce se vieron facilitadas por la  
1250 variación existente en el locus *Eda* en poblaciones marinas ancestrales (Colosimo et al. 2005;  
1251 ver Turbek et al. 2021 para un ejemplo similar en aves). Del mismo modo, cada vez se acepta  
1252 más que la hibridación e introgresión pueden promover la divergencia a través del  
1253 reensamblaje de variantes genéticas antiguas en combinaciones novedosas (la "visión  
1254 combinatoria" de la especiación; Marques et al. 2019). Datos genómicos recientes apoyan  
1255 este mecanismo, en particular en las radiaciones de las mariposas *Heliconius*, pinzones de  
1256 Darwin, peces cíclidos y flores mono, donde el flujo genético interespecífico parece haber  
1257 dado lugar al intercambio de alelos beneficiosos, facilitando así una mayor divergencia  
1258 (Lamichhaney et al. 2015; Stankowski y Streisfeld 2015; The Heliconius Genome  
1259 Consortium et al. 2012). La hibridación antigua también puede haber desencadenado

1260 radiaciones adaptativas completas al generar nuevas combinaciones alélicas, seguidas de  
1261 periodos de segregación en entornos ecológicos distintos, como parece ser el caso de la  
1262 evolución del gen de la *opsina* en los peces cíclidos del lago Victoria (Meier et al. 2017). Del  
1263 mismo modo, se cree que la hibridación antigua inició la rápida evolución de los cambios de  
1264 hospedero entre razas de moscas *Rhagoletis* (Feder et al. 2003).

1265         A pesar de estos ejemplos de los orígenes de variación adaptativa, es posible  
1266 comprender mejor la historia de los rasgos adaptativos que contribuyen al aislamiento  
1267 precigótico cuando los estudios genéticos se integran con el campo de la biología evolutiva  
1268 del desarrollo (evo-devo). En particular, dado que los organismos se construyen mediante  
1269 programas genéticos que se despliegan secuencialmente durante el desarrollo, la pleiotropía  
1270 puede limitar los cambios genéticos que contribuyen a la evolución fenotípica. De hecho, se  
1271 ha argumentado que es más probable que la adaptación se produzca a través de cambios en la  
1272 regulación de genes, ya que estas mutaciones son a menudo menos propensas a sufrir  
1273 penalizaciones de éxito reproductivo debido a la pleiotropía en comparación con los cambios  
1274 en las secuencias que codifican proteínas (Stern y Orgogozo 2008; Prud'homme et al. 2007).  
1275 Aunque la evidencia emergente sugiere que los elementos reguladores de genes pueden ser  
1276 más pleiotrópicos de lo que se pensaba (Preger-Ben Noon et al. 2018; Navy et al. 2018;  
1277 Lewis et al. 2019; Fuqua et al. 2020; Mazo-Vargas et al. 2022; 8), la diversificación de  
1278 numerosos rasgos fenotípicos, incluidos aquellos implicados en aislamiento precigótico, se ha  
1279 relacionado a menudo con cambios en la regulación genética que afectan al desarrollo, en  
1280 lugar de con mutaciones en regiones codificantes (Abzhanov et al. 2004; Martin et al. 2012;  
1281 Reed et al. 2011; Unbehend et al. 2021). Además, la variación en la estructura de la red de  
1282 regulación genética puede influir enormemente en la trayectoria de la adaptación, dando lugar  
1283 potencialmente a resultados evolutivos predecibles, incluida la reutilización de ciertos tipos  
1284 de mutaciones o genes específicos (Martin y Orgogozo 2013; Sobel y Streisfeld 2013).

1285         Un ejemplo de cómo la pleiotropía y la organización de redes reguladoras de genes  
1286 pueden influir en la genética del aislamiento precigótico proviene de las transiciones de color  
1287 de flores que provocan aislamiento de polinizadores. Las antocianinas son pigmentos florales  
1288 comunes responsables de las flores rojas, rosas, azules y púrpuras (Grotewold 2006). La  
1289 mayoría de las plantas también producen antocianinas en los tejidos vegetativos, donde  
1290 intervienen en diversas respuestas fisiológicas al estrés (Winkel-Shirley 2002). Los  
1291 componentes estructurales y reguladores necesarios para la producción de antocianinas están

1292 muy conservados, y la red que coordina la regulación de las enzimas antociánicas se ha  
1293 convertido en un paradigma para entender la regulación combinatoria de genes en plantas  
1294 (Koes et al. 2005). Tres tipos de factores de transcripción forman un complejo multiproteico  
1295 (conocido como complejo MBW) que regula características de la diferenciación celular  
1296 epidérmica, incluyendo la síntesis de antocianinas (Ramsay y Glover 2005). Entre las  
1297 familias de genes que codifican las proteínas que forman este complejo, una (las R2R3-  
1298 MYBs) contiene múltiples copias que se sabe que regulan las antocianinas (Stracke et al.  
1299 2001). Estas duplicaciones dan lugar a redundancia funcional y generan especificidad tisular  
1300 en la pigmentación antociánica. Esta redundancia implica que cada proteína MYB de la red  
1301 tiene menor conectividad y menos efectos pleiotrópicos que otros miembros del complejo  
1302 MBW (Sobel y Streisfeld 2013) (Figura 3A). De hecho, a pesar de la posibilidad de que  
1303 mutaciones en numerosos genes generen fenotipos de color floral similares, todos los  
1304 ejemplos que implican divergencia en la intensidad del pigmento antociánico floral entre  
1305 especies han sido causados por mutaciones en MYBs (Streisfeld y Rausher 2011). Así pues,  
1306 la organización del complejo MBW y la reducida pleiotropía de las mutaciones en MYB  
1307 parecen determinar qué genes tienen más probabilidades de estar implicados en aislamiento  
1308 precigótico.

1309           La necesidad de mantener la funcionalidad en niveles superiores de organización  
1310 biológica también puede determinar qué mutaciones contribuyen al aislamiento precigótico.  
1311 Por ejemplo, se ha demostrado repetidamente que los cambios genéticos en la periferia  
1312 sensorial de los animales, en particular cambios en la codificación de proteínas en los  
1313 receptores olfativos/gustativos, subyacen a la evolución de aislamiento comportamental  
1314 (Leary et al. 2012; Fan et al. 2013; Prieto-Godino et al. 2017; Ahmed et al. 2019; Brand et al.  
1315 2020). Esto podría deberse a que los cambios en los genes quimiorreceptores tienen menos  
1316 efectos desadaptativos en el funcionamiento neural en comparación con los cambios en los  
1317 circuitos cerebrales río abajo/centrales (Figura 3B). Sin embargo, sigue siendo incierto si  
1318 estos patrones emergentes reflejan simplemente el sesgo derivado de la trazabilidad  
1319 experimental de la periferia sensorial (Cande et al. 2013; Zhao y McBride 2020), y si se  
1320 extienden a través de diferentes modalidades sensoriales. Se necesita más investigación para  
1321 confirmar los patrones generales que subyacen a la historia evolutiva de los alelos  
1322 comportamentales implicados en el aislamiento precigótico. Por ejemplo, los cambios en los  
1323 circuitos neuronales centrales aguas abajo de los receptores sensoriales también están

1324 implicados en la evolución de las preferencias de apareamiento divergentes guiadas por el  
1325 olfato entre especies (Seeholzer et al. 2018; Khallaf et al. 2020). En conclusión, al igual que  
1326 otras formas de evolución fenotípica, la fuente genética de los rasgos que contribuyen al AR  
1327 probablemente son el resultado de fuerzas evolutivas que favorecen alelos con efectos  
1328 pleiotrópicos mínimos, al tiempo que maximizan cambios adaptativos en un entorno  
1329 determinado.

1330

### 1331 **¿Cómo las barreras precigóticas afectan el flujo genético?**

1332 Aunque identificar los loci que contribuyen al aislamiento precigótico es importante para  
1333 poner a prueba preguntas de larga data sobre la genética de la especiación, en última instancia  
1334 queremos saber hasta qué punto las barreras precigóticas reducen el flujo genético entre  
1335 poblaciones divergentes. Las estimaciones de la fuerza del AR pretenden cuantificar la  
1336 reducción del flujo genético potencial entre poblaciones (Coyne y Orr 2004; Sobel y Chen  
1337 2014). Aunque la medición de los componentes del AR ha demostrado ser útil para comparar  
1338 la prevalencia y la fuerza de diferentes tipos de barreras a través de los sistemas (Coyne y Orr  
1339 1997; Christie et al. 2022), todavía sabemos poco acerca de cómo la fuerza del AR se  
1340 corresponde con la reducción del flujo genético. La ausencia de cualquier AR debería dar  
1341 lugar a una homogeneización genética, mientras que un AR completo debería impedir todo  
1342 flujo genético, permitiendo a las poblaciones evolucionar de forma independiente. Sin  
1343 embargo, en valores intermedios, como los que suelen darse entre pares de taxa que presentan  
1344 al menos cierto solapamiento geográfico, es posible que el AR no tenga una relación lineal  
1345 con el flujo genético. Es importante destacar que, con un AR incompleto, los patrones de flujo  
1346 genético y/o divergencia a través del genoma pueden ser complejos y variar entre loci  
1347 neutros, loci bajo selección divergente y loci ligados a loci seleccionados (Nosil y Feder  
1348 2012; Cruickshank y Hahn 2014). La arquitectura genética del AR y las tasas de  
1349 recombinación local también determinarían cómo y cuándo los loci bajo selección divergente  
1350 permanecen distintos frente al flujo genético (Schumer et al. 2018; Kautt et al. 2020). Por lo  
1351 tanto, comprender la relación entre la fuerza y el tipo de barreras precigóticas y el flujo  
1352 génico alcanzado a través del genoma es fundamental para comprender las circunstancias en  
1353 las que el aislamiento precigótico causaría especiación.

1354 El aislamiento precigótico y poscigótico puede tener diferentes efectos sobre el flujo  
1355 genético. Las barreras precigóticas de acción temprana pueden ser más eficaces a la hora de

1356 evitar el flujo genético, ya que impiden la formación de híbridos y actúan al principio del  
1357 ciclo de vida, antes de que puedan actuar otras barreras (Coyne y Orr 1997; Ramsey et al.  
1358 2003). Sin embargo, también pueden variar en fuerza con el contexto ecológico más que las  
1359 barreras poscigóticas (por ejemplo, Hausmann et al. 2021; Sianta y Kay 2021). Por el  
1360 contrario, se espera que las barreras poscigóticas intrínsecas sean consistentes en todos los  
1361 entornos. Sin embargo, los híbridos, especialmente más allá de la generación F1, pueden  
1362 mostrar una amplia variación genotípica, fenotípica y de éxito reproductivo, de modo que el  
1363 flujo genético total puede ser elevado incluso cuando el éxito reproductivo de los híbridos es  
1364 bajo (revisado en Arnold et al. 2012; Rieseberg et al. 1999). En muchos casos, el impacto del  
1365 aislamiento precigótico sobre el flujo genético se confundiría con el de las barreras  
1366 poscigóticas, ya sea por sus efectos independientes sobre el flujo genético en el mismo par de  
1367 taxa o por la contribución de los mismos rasgos tanto al aislamiento precigótico como  
1368 poscigótico extrínseco.

1369 Otro reto para comprender los efectos del aislamiento precigótico sobre el flujo  
1370 genético es que los estudios de genética de poblaciones varían mucho en diseño y  
1371 metodología, por lo que a menudo son difíciles de comparar. En concreto, los tipos de  
1372 marcadores utilizados, incluida su cobertura a lo largo del genoma y nivel de polimorfismo,  
1373 así como el muestreo de la población, influirían en las estimaciones del flujo genético  
1374 (revisado en Westram et al. 2022). Los métodos analíticos para evaluar el flujo genético  
1375 también varían ampliamente. Muchos estudios que sacan conclusiones sobre el flujo genético  
1376 sólo reportan los patrones de divergencia genética dentro y entre los taxa, pero estos pueden  
1377 verse afectados por ancestría compartida y características intrapoblacionales, como el tamaño  
1378 de la población y el sistema de apareamiento. Pocos estudios evalúan directamente las tasas  
1379 de migración o, lo que es aún más importante, la variación de las tasas de migración a lo  
1380 largo del genoma. Con los datos del genoma completo, se pueden utilizar modelos  
1381 demográficos para estimar una serie de parámetros poblacionales, incluidas las tasas de  
1382 migración direccional y la variación en la tasa de migración a través del genoma (por  
1383 ejemplo, Gutenkunst et al. 2009; Excoffier et al. 2021; Laetsch et al. 2022). Sin embargo, el  
1384 campo aún no se ha unido en torno a un enfoque estándar (revisado en Westram et al. 2022).  
1385 Por lo tanto, el depósito de datos brutos en repositorios públicos es clave para futuros análisis  
1386 comparativos de las relaciones complejas entre flujo genético y AR.

1387 Una forma de sortear la variabilidad en el muestreo y el análisis puede ser evaluar



1388 tanto el flujo genético direccional como las estimaciones direccionales de aislamiento  
1389 precigótico dentro del mismo estudio (así como Sundqvist et al. 2016). Por ejemplo,  
1390 centrándose en la transferencia interespecífica de polen en plantas, Moreira-Hernández y  
1391 Muchhala (2019) compararon la fuerza y la asimetría de las barreras precigóticas con la  
1392 dirección predominante del flujo de genes en diez sistemas. Encontraron que solo cuatro de  
1393 diez sistemas mostraron concordancia en la dirección de la asimetría entre las barreras de  
1394 transferencia de polen y el flujo de genes, tres mostraron patrones contradictorios y el resto  
1395 fueron mixtos. En dos de los tres casos en los que los patrones no coincidían, las barreras  
1396 poscigóticas eran las responsables del patrón observado de flujo genético. Otro ejemplo  
1397 proviene de los girasoles, en los que Sambatti et al. (2012) encontraron flujo genético  
1398 sustancial entre las dos especies focales a pesar de un aislamiento precigótico muy alto y un  
1399 AR acumulado casi completo. La direccionalidad del flujo genético no coincide con la  
1400 asimetría en el aislamiento precigótico, de nuevo debido potencialmente a la asimetría  
1401 opuesta en el aislamiento poscigótico. Estos ejemplos subrayan la importancia de considerar  
1402 las barreras precigóticas y poscigóticas en el mismo sistema para desentrañar su impacto en el  
1403 flujo genético. Investigaciones futuras sobre la eficacia de las barreras precigóticas podría  
1404 beneficiarse al centrarse en sistemas en los que se sepa que el aislamiento poscigótico es débil  
1405 o inexistente.

1406 El punto de vista complementario a la pregunta de cómo se relaciona el aislamiento  
1407 precigótico con el flujo genético es preguntarse si los patrones de flujo genético o divergencia  
1408 genética pueden ayudarnos a entender los rasgos o loci que contribuyen al aislamiento  
1409 reproductivo. Los escaneos genómicos pueden ayudar a identificar loci bajo selección  
1410 divergente que pueden contribuir al aislamiento precigótico y que se ajustan a los modelos de  
1411 dos alelos de AR, aunque deben interpretarse con cuidado para evitar factores de confusión y  
1412 falsos positivos (Marigorta et al. 2018). Se han encontrado patrones heterogéneos de  
1413 divergencia genómica en una variedad de sistemas (por ejemplo, Westram et al. 2018; Martin  
1414 et al. 2013; Vijay et al. 2016; Poelstra et al. 2014; Malinsky et al. 2015; Riesch et al. 2017;  
1415 Marques et al. 2016), pero rara vez tenemos información correspondiente sobre los rasgos  
1416 que contribuyen al AR para conectarlos con estos patrones (pero ver Stankowski et al. 2023  
1417 para un intento en esta dirección).

1418

1419 **Conclusiones**

1420 A pesar de décadas de progreso en la comprensión de la genética del aislamiento precigótico,  
1421 vemos oportunidades para futuros avances. La mejora de las tecnologías genéticas,  
1422 genómicas y de fenotipado permitirá una disección más fina y una caracterización funcional  
1423 del aislamiento precigótico, proporcionando respuestas a preguntas básicas sobre su  
1424 arquitectura genética en diversos sistemas y ayudándonos a ir más allá de estudios QTL  
1425 difíciles de comparar (ver también el capítulo de Delmore et al., en este volumen).  
1426 Destacamos una brecha entre la expectativa teórica de que los mecanismos de un alelo  
1427 proporcionan la ruta más fácil para que el aislamiento precigótico evolucione frente al flujo  
1428 genético, y nuestra capacidad para detectar este tipo de variación genética con los enfoques  
1429 predominantes que caracterizan las diferencias entre especies. También vemos oportunidades  
1430 para una mayor integración de la evo-devo con la genética de la especiación. La comprensión  
1431 de los programas de desarrollo en los que se insertan los rasgos aislantes precigóticos  
1432 conducirá a mejores predicciones sobre las limitaciones de su evolución. Además, queda  
1433 mucho trabajo por hacer para entender cómo el aislamiento precigótico y postcigótico  
1434 determinan el flujo genético y los patrones de divergencia genética en el genoma. La  
1435 creciente accesibilidad a la secuenciación de genomas completos y el desarrollo de métodos  
1436 computacionales para estimar explícitamente las tasas de migración permitirán comparar la  
1437 fuerza del AR con los niveles de flujo genético en múltiples taxa y tipos de barreras de  
1438 aislamiento.

1439 Por último, incluimos ejemplos de plantas y animales con la esperanza de integrar  
1440 mejor nuestra comprensión del aislamiento precigótico. Creemos que esto pone de relieve  
1441 principios comunes a pesar de sus biología divergentes. Queda por determinar si existen  
1442 diferencias sustanciales en la genética del aislamiento precigótico entre grupos taxonómicos,  
1443 independientemente de los sesgos metodológicos.

1444

#### 1445 **Agradecimientos**

1446 Queremos agradecer a A. Holtz por la edición de las citas y referencias. Los autores fueron  
1447 financiados por las siguientes fuentes mientras trabajaban en este proyecto: H.A.C. Australian  
1448 Research Council DP190103039; M.R. & R.M.M. DFG GZ: ME 4845/1-1; R.M.M. ERC  
1449 Starter Grant 851040; K.M.K & J.G.H. NSF DEB 1737889; M.A.S. NSF DEB 2051242;  
1450 A.F.F. Swiss National Science Foundation Postdoc Mobility Grant 203023. Para generar una

1451 primera versión de este manuscrito en español, usamos la versión gratuita de *DeepL* para  
1452 traducir el contenido de inglés a español.

1453

#### 1454 **Contribución de autores**

1455 Todos los autores contribuyeron al desarrollo conceptual, escritura y generación de figuras.

1456

#### 1457 **Referencias**

1458 Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A,  
1459 Buerkle CA, Buggs R, et al. 2013. Hybridization and speciation. *J Evol Biol* **26**: 229–  
1460 246.

1461 Abzhanov A, Protas M, Grant BR, Grant PR, Tabin CJ. 2004. Bmp4 and morphological  
1462 variation of beaks in Darwin’s finches. *Science* **305**: 1462–1465.

1463 Ahmed OM, Avila-Herrera A, Tun KM, Serpa PH, Peng J, Parthasarathy S, Knapp J-M,  
1464 Stern DL, Davis GW, Pollard KS, et al. 2019. Evolution of mechanisms that control  
1465 mating in *Drosophila* males. *Cell Rep* **27**: 2527–2536.

1466 Arbuthnott D. 2009. The genetic architecture of insect courtship behavior and premating  
1467 isolation. *Heredity* **103**: 15–22.

1468 Arnold ML, ed. 2015. Divergence with genetic exchange. In *Divergence with Genetic*  
1469 *Exchange*, Oxford University Press.

1470 Arnold ML, Ballerini ES, Brothers AN. 2012. Hybrid fitness, adaptation and evolutionary  
1471 diversification: lessons learned from Louisiana Irises. *Heredity* **108**: 159–166.

1472 Barghi N, Hermisson J, Schlötterer C. 2020. Polygenic adaptation: a unifying framework to  
1473 understand positive selection. *Nat Rev Genet* **21**: 769–781.

1474 Barnwell CV, Noor MAF. 2008. Failure to replicate two mate preference QTLs across  
1475 multiple strains of *Drosophila pseudoobscura*. *J Hered* **99**: 653–656.

- 1476 Barrett R, Schluter D. 2008. Adaptation from standing genetic variation. **23**: 38–44.
- 1477 Bay RA, Arnegard ME, Conte GL, Best J, Bedford NL, McCann SR, Dubin ME, Chan YF,  
1478 Jones FC, Kingsley DM, et al. 2017. Genetic coupling of female mate choice with  
1479 polygenic ecological divergence facilitates stickleback speciation. *Curr Biol* **27**: 3344-  
1480 3349.e4.
- 1481 Beavis WD, Smith OS, Grant D, Fincher R. 1994. Identification of quantitative trait loci  
1482 using a small sample of topcrossed and F4 progeny from maize. *Crop Sci* **34**:  
1483 crops1994.0011183X003400040010x.
- 1484 Bomblies K, Peichel CL. 2022. Genetics of adaptation. *Proc Natl Acad Sci* **119**:  
1485 e2122152119.
- 1486 Bradshaw HD, Schemske DW. 2003. Allele substitution at a flower colour locus produces a  
1487 pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* **426**: 176–178.
- 1488 Bradshaw HD, Wilbert SM, Otto KG, Schemske DW. 1995. Genetic mapping of floral traits  
1489 associated with reproductive isolation in monkeyflowers (*Mimulus*). *Nature* **376**: 762–  
1490 765.
- 1491 Brand P, Hinojosa-Díaz IA, Ayala R, Daigle M, Yurrita Obiols CL, Eltz T, Ramírez SR.  
1492 2020. The evolution of sexual signaling is linked to odorant receptor tuning in  
1493 perfume-collecting orchid bees. *Nat Commun* **11**: 244.
- 1494 Butlin RK, Servedio MR, Smadja CM, Bank C, Barton NH, Flaxman SM, Giraud T, Hopkins  
1495 R, Larson EL, Maan ME, et al. 2021. Homage to Felsenstein 1981, or why are there  
1496 so few/many species? *Evolution* **75**: 978–988.
- 1497 Cande J, Prud'homme B, Gompel N. 2013. Smells like evolution: the role of chemoreceptor  
1498 evolution in behavioral change. *Curr Opin Neurobiol* **23**: 152–158.
- 1499 Charlesworth D, Charlesworth B. 1979. Selection on recombination in clines. *Genetics* **91**:

1500 581–589.

1501 Chenoweth SF, Blows MW. 2006. Dissecting the complex genetic basis of mate choice. *Nat*  
1502 *Rev Genet* **7**: 681–692.

1503 Chenoweth SF, McGuigan K. 2010. The genetic basis of sexually selected variation. *Annu*  
1504 *Rev Ecol Evol Syst* **41**: 81–101.

1505 Christie K, Fraser LS, Lowry DB. 2022. The strength of reproductive isolating barriers in  
1506 seed plants: insights from studies quantifying premating and postmating reproductive  
1507 barriers over the past 15 years. *Evolution* **76**: 2228–2243.

1508 Colosimo PF, Hosemann KE, Balabhadra S, Villarreal G, Dickson M, Grimwood J, Schmutz  
1509 J, Myers RM, Schluter D, Kingsley DM. 2005. Widespread parallel evolution in  
1510 sticklebacks by repeated fixation of ectodysplasin alleles. *Science* **307**: 1928–1933.

1511 Conte GL, Schluter D. 2013. Experimental confirmation that body size determines mate  
1512 preference via phenotype matching in a stickleback species pair. *Evolution* **67**: 1477–  
1513 1484.

1514 Coyne JA, Orr HA. 1997. “Patterns of speciation in *Drosophila*” revisited. *Evolution* **51**:  
1515 295–303.

1516 Coyne JA, Orr HA. 2004. *Speciation*. Oxford University Press, Oxford, New York.

1517 Cruickshank TE, Hahn MW. 2014. Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are  
1518 due to reduced diversity, not reduced gene flow. *Mol Ecol* **23**: 3133–3157.

1519 Excoffier L, Marchi N, Marques DA, Matthey-Doret R, Gouy A, Sousa VC. 2021.  
1520 Fastsimcoal2: demographic inference under complex evolutionary scenarios.  
1521 *Bioinformatics* **37**: 4882–4885.

1522 Fan P, Manoli DS, Ahmed OM, Chen Y, Agarwal N, Kwong S, Cai AG, Neitz J, Renslo A,  
1523 Baker BS, et al. 2013. Genetic and neural mechanisms that inhibit *Drosophila* from

1524 mating with other species. *Cell* **154**: 89–102.

1525 Feder JL, Berlocher SH, Roethele JB, Dambroski H, Smith JJ, Perry WL, Gavrilovic V,  
1526 Filchak KE, Rull J, Aluja M. 2003. Allopatric genetic origins for sympatric host-plant  
1527 shifts and race formation in *Rhagoletis*. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 10314–10319.

1528 Felsenstein J. 1981. Skepticism towards Santa Rosalia, or why are there so few kinds of  
1529 animals? *Evolution* **35**: 124–138.

1530 Ferris KG, Barnett LL, Blackman BK, Willis JH. 2017. The genetic architecture of local  
1531 adaptation and reproductive isolation in sympatry within the *Mimulus guttatus* species  
1532 complex. *Mol Ecol* **26**: 208–224.

1533 Fishman L, Stathos A, Beardsley PM, Williams CF, Hill JP. 2013. Chromosomal  
1534 rearrangements and the genetics of reproductive barriers in *Mimulus*  
1535 (monkeyflowers). *Evol Int J Org Evol* **67**: 2547–2560.

1536 Fuqua T, Jordan J, van Breugel ME, Halavatyi A, Tischler C, Polidoro P, Abe N, Tsai A,  
1537 Mann RS, Stern DL, et al. 2020. Dense and pleiotropic regulatory information in a  
1538 developmental enhancer. *Nature* **587**: 235–239.

1539 Gavrillets S. 2004. *Fitness landscapes and the origin of species*. Princeton University Press,  
1540 Princeton, New Jersey.

1541 Gavrillets S, Vose A. 2007. Case studies and mathematical models of ecological speciation. 2.  
1542 palms on an oceanic island. *Mol Ecol* **16**: 2910–2921.

1543 Grotewold E, ed. 2006. *The science of flavonoids*. Springer, New York, NY  
1544 <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-28822-2>.

1545 Gutenkunst RN, Hernandez RD, Williamson SH, Bustamante CD. 2009. Inferring the joint  
1546 demographic history of multiple populations from multidimensional SNP frequency  
1547 data. *PLOS Genet* **5**: e1000695.

- 1548 Hausmann AE, Kuo C-Y, Freire M, Rueda-M N, Linares M, Pardo-Diaz C, Salazar C,  
1549 Merrill RM. 2021. Light environment influences mating behaviours during the early  
1550 stages of divergence in tropical butterflies. *Proc R Soc B Biol Sci* **288**: 20210157.
- 1551 Hawthorne DJ, Via S. 2001. Genetic linkage of ecological specialization and reproductive  
1552 isolation in pea aphids. *Nature* **412**: 904–907.
- 1553 Hench K, Vargas M, Höppner MP, McMillan WO, Puebla O. 2019. Inter-chromosomal  
1554 coupling between vision and pigmentation genes during genomic divergence. *Nat*  
1555 *Ecol Evol* **3**: 657–667.
- 1556 Hermann K, Klahre U, Moser M, Sheehan H, Mandel T, Kuhlemeier C. 2013. Tight genetic  
1557 linkage of prezygotic barrier loci creates a multifunctional speciation island in  
1558 *Petunia*. *Curr Biol* **23**: 873–877.
- 1559 Higashi M, Takimoto G, Yamamura N. 1999. Sympatric speciation by sexual selection.  
1560 *Nature* **402**: 523–526.
- 1561 Hileman LC. 2014. Trends in flower symmetry evolution revealed through phylogenetic and  
1562 developmental genetic advances. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **369**: 20130348.
- 1563 Huang K, Rieseberg LH. 2020. Frequency, origins, and evolutionary role of chromosomal  
1564 inversions in plants. *Front Plant Sci* **11**.  
1565 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00296>.
- 1566 Jamie G, Van Bellegham SM, Hogan BG, Hamama S, Moya C, Troscianko J, Stoddard MS,  
1567 Kilner RM, Spottiswoode CN. 2020. Multimodal mimicry of hosts in a radiation of  
1568 parasitic finches. *Evololution*. **74**: 2526-2538.
- 1569 Jiggins CD, Naisbit RE, Coe RL, Mallet J. 2001. Reproductive isolation caused by colour  
1570 pattern mimicry. *Nature* **411**: 302–305.
- 1571 Kautt AF, Kratochwil CF, Nater A, Machado-Schiaffino G, Olave M, Henning F, Torres-

1572 Dowdall J, Härer A, Hulsey CD, Franchini P, et al. 2020. Contrasting signatures of  
1573 genomic divergence during sympatric speciation. *Nature* **588**: 106–111.

1574 Kay KM, Surget-Groba Y. 2022. The genetic basis of floral mechanical isolation between  
1575 two hummingbird-pollinated neotropical understory herbs. *Mol Ecol* **31**: 4351–4363.

1576 Kay KM, Voelckel C, Yang JY, Hufford KM, Kaska DD, Hodges SA. 2006. Floral characters  
1577 and species diversification. In *Ecology and Evolution of Flowers* (eds. L.D. Harder  
1578 and S.C.H. Barrett), pp. 311–325, Oxford University Press, Oxford.

1579 Khallaf MA, Auer TO, Grabe V, Depetris-Chauvin A, Ammagarahalli B, Zhang D-D,  
1580 Lavista-Llanos S, Kaftan F, Weißflog J, Matzkin LM, et al. 2020. Mate discrimination  
1581 among subspecies through a conserved olfactory pathway. *Sci Adv* **6**: eaba5279.

1582 Kirkpatrick M. 1982. Sexual selection and the evolution of female choice. *Evolution* **36**: 1–  
1583 12.

1584 Kirkpatrick M, Barton N. 2006. Chromosome inversions, local adaptation and speciation.  
1585 *Genetics* **173**: 419–434.

1586 Kirkpatrick M, Ravigné V. 2002. Speciation by natural and sexual selection: models and  
1587 experiments. *Am Nat* **159**: S22–S35.

1588 Klahre U, Gurba A, Hermann K, Saxenhofer M, Bossolini E, Guerin PM, Kuhlemeier C.  
1589 2011. Pollinator choice in *Petunia* depends on two major genetic loci for floral scent  
1590 production. *Curr Biol* **21**: 730–739.

1591 Knowlton N, Weigt LA, Solórzano LA, Mills DK, Bermingham E. 1993. Divergence in  
1592 proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the isthmus of  
1593 Panama. *Science* **260**: 1629–1632.

1594 Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation  
1595 and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* **10**: 236–242.



1596 Kopp M, Servedio MR, Mendelson TC, Safran RJ, Rodríguez RL, Hauber ME, Scordato EC,  
1597 Symes LB, Balakrishnan CN, Zonana DM, et al. 2018. Mechanisms of assortative  
1598 mating in speciation with gene flow: connecting theory and empirical research. *Am*  
1599 *Nat* **191**: 1–20.

1600 Laetsch DR, Bisschop G, Martin SH, Aeschbacher S, Setter D, Lohse K. 2022.  
1601 Demographically explicit scans for barriers to gene flow using gIMble.  
1602 2022.10.27.514110. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.10.27.514110v1>.

1603 Lamichhaney S, Berglund J, Almén MS, Maqbool K, Grabherr M, Martinez-Barrio A,  
1604 Promerová M, Rubin C-J, Wang C, Zamani N, et al. 2015. Evolution of Darwin’s  
1605 finches and their beaks revealed by genome sequencing. *Nature* **518**: 371–375.

1606 Langerhans RB, Gifford ME, Joseph EO. 2007. Ecological speciation in *Gambusia* fishes.  
1607 *Evolution* **61**: 2056–2074.

1608 Leary GP, Allen JE, Bunker PL, Luginbill JB, Linn CE, Macallister IE, Kavanaugh MP,  
1609 Wanner KW. 2012. Single mutation to a sex pheromone receptor provides adaptive  
1610 specificity between closely related moth species. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 14081–  
1611 14086.

1612 Lewis JJ, Geltman RC, Pollak PC, Rondem KE, Van Belleghem SM, Hubisz MJ, Munn  
1613 PM, Zhang L, Benson C, Mazo-Vargas A1, Danko CG, Counterman BA, Papa R,  
1614 Reed R 2019 Parallel evolution of ancient, pleiotropic enhancers underlies butterfly  
1615 wing pattern mimicry/ *Proc Natl Acad Sci* **116** 4174-24183;

1616 Liang M, Chen W, LaFountain AM, Liu Y, Peng F, Xia R, Bradshaw HD, Yuan Y-W. 2023.  
1617 Taxon-specific, phased siRNAs underlie a speciation locus in monkeyflowers. *Science*  
1618 **379**: 576–582.

1619 Lowry DB, Willis JH. 2010. A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes

1620 to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation. *PLoS*  
1621 *Biol* **8**: e1000500.

1622 Maan ME, Seehausen O, Groothuis TGG. 2017. Differential survival between visual  
1623 environments supports a role of divergent sensory drive in cichlid fish speciation. *Am*  
1624 *Nat* **189**: 78–85.

1625 Malinsky M, Challis RJ, Tyers AM, Schiffels S, Terai Y, Ngatunga BP, Miska EA, Durbin R,  
1626 Genner MJ, Turner GF. 2015. Genomic islands of speciation separate cichlid  
1627 ecomorphs in an East African crater lake. *Science* **350**: 1493–1498.

1628 Marigorta UM, Rodríguez JA, Gibson G, Navarro A. 2018. Replicability and prediction:  
1629 lessons and challenges from GWAS. *Trends Genet* **34**: 504–517.

1630 Marques DA, Lucek K, Meier JI, Mwaiko S, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O. 2016.  
1631 Genomics of rapid incipient speciation in sympatric threespine stickleback. *PLOS*  
1632 *Genet* **12**: e1005887.

1633 Marques DA, Meier JI, Seehausen O. 2019. A combinatorial view on speciation and adaptive  
1634 radiation. *Trends Ecol Evol* **34**: 531–544.

1635 Martin A, Orgogozo V. 2013. The loci of repeated evolution: a catalog of genetic hotspots of  
1636 phenotypic variation. *Evolution* **67**: 1235–1250.

1637 Martin A, Papa R, Nadeau NJ, Hill RI, Counterman BA, Halder G, Jiggins CD, Kronforst  
1638 MR, Long AD, McMillan WO, et al. 2012. Diversification of complex butterfly wing  
1639 patterns by repeated regulatory evolution of a Wnt ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
1640 **109**: 12632–12637.

1641 Martin SH, Dasmahapatra KK, Nadeau NJ, Salazar C, Walters JR, Simpson F, Blaxter M,  
1642 Manica A, Mallet J, Jiggins CD. 2013. Genome-wide evidence for speciation with  
1643 gene flow in *Heliconius* butterflies. *Genome Res* **23**: 1817–1828.

- 1644 Matsubayashi KW, Ohshima I, Nosil P. 2010. Ecological speciation in phytophagous insects.  
1645 *Entomol Exp Appl* **134**: 1–27.
- 1646 Maynard Smith J. 1966. Sympatric speciation. *Am Nat* **100**: 637–650.
- 1647 Mazo-Vargas A, Langmüller AM, Wilder A, van der Burg KRL, Lewis JJ, Messer PW,  
1648 Zhang L, Martin A, Reed RD. 2022. Deep cis-regulatory homology of the butterfly  
1649 wing pattern ground plan. *Science* **378**: 304–308.
- 1650 McNiven VTK, Moehring AJ. 2013. Identification of genetically linked female preference  
1651 and male trait. *Evolution* **67**: 2155–2165.
- 1652 Meier JJ, Marques DA, Mwaiko S, Wagner CE, Excoffier L, Seehausen O. 2017. Ancient  
1653 hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations. *Nat Commun* **8**: 14363.
- 1654 Merrill RM, Rastas P, Martin SH, Melo MC, Barker S, Davey J, McMillan WO, Jiggins CD.  
1655 2019. Genetic dissection of assortative mating behavior. *PLOS Biol* **17**: e2005902.
- 1656 Merrill RM, Wallbank RWR, Bull V, Salazar PCA, Mallet J, Stevens M, Jiggins CD. 2012.  
1657 Disruptive ecological selection on a mating cue. *Proc R Soc B Biol Sci* **279**: 4907–  
1658 4913.
- 1659 Moreira-Hernández JJ, Muchhala N. 2019. Importance of pollinator-mediated interspecific  
1660 pollen transfer for angiosperm evolution. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **50**: 191–217.
- 1661 Nagy, O, Nuez I, Savisaar, R, Peluffo AE, Yassin A, Lang M, Stern DL, Matute D,  
1662 David JR, Courtier-Orgogozo V. Correlated Evolution of Two Copulatory Organs via  
1663 a Single *cis*-Regulatory Nucleotide Change. *Curr Biol* **28**: 3450-3457
- 1664 Nosil P. 2012. *Ecological speciation*. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- 1665 Nosil P, Feder JL. 2012. Widespread yet heterogeneous genomic divergence. *Mol Ecol* **21**:  
1666 2829–2832.
- 1667 Orr HA. 2005. The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nat Rev Genet* **6**: 119–127.
- 1668 Ortíz-Barrientos D, Noor MAF. 2005. Evidence for a one-allele assortative mating locus.

- 1669           *Science* **310**: 1467–1467.
- 1670   Pinho C, Hey J. 2010. Divergence with gene flow: models and data. *Annu Rev Ecol Evol Syst*  
1671           **41**: 215–230.
- 1672   Podos J. 2001. Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin’s  
1673           finches. *Nature* **409**: 185–188.
- 1674   Poelstra JW, Vijay N, Bossu CM, Lantz H, Ryll B, Müller I, Baglione V, Unneberg P,  
1675           Wikelski M, Grabherr MG, et al. 2014. The genomic landscape underlying  
1676           phenotypic integrity in the face of gene flow in crows. *Science* **344**: 1410–1414.
- 1677   Preger-Ben Noon E, Sabarís G, Ortiz DM, Sager J, Liebowitz A, Stern DL, Frankel N. 2018.  
1678           Comprehensive analysis of a cis-regulatory region reveals pleiotropy in enhancer  
1679           function. *Cell Rep* **22**: 3021–3031.
- 1680   Prieto-Godino LL, Rytz R, Cruchet S, Bargeton B, Abuin L, Silbering AF, Ruta V, Dal  
1681           Peraro M, Benton R. 2017. Evolution of acid-sensing olfactory circuits in  
1682           Drosophilids. *Neuron* **93**: 661-676.e6.
- 1683   Prud’homme B, Gompel N, Carroll SB. 2007. Emerging principles of regulatory evolution.  
1684           *Proc Natl Acad Sci* **104**: 8605–8612.
- 1685   Pryke SR. 2010. Sex chromosome linkage of mate preference and color signal maintains  
1686           assortative mating between interbreeding finch morphs. *Evolution* **64**: 1301–1310.
- 1687   Ramsay NA, Glover BJ. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of  
1688           cellular diversity. *Trends Plant Sci* **10**: 63–70.
- 1689   Ramsey J, Bradshaw HD JR, Schemske DW. 2003. Components of reproductive isolation  
1690           between the monkeyflowers *Mimulus lewesii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae).  
1691           *Evolution* **57**: 1520–1534.
- 1692   Reed RD, Papa R, Martin A, Hines HM, Counterman BA, Pardo-Diaz C, Jiggins CD,

1693 Chamberlain NL, Kronforst MR, Chen R, et al. 2011. Optix drives the repeated  
1694 convergent evolution of butterfly wing pattern mimicry. *Science* **333**: 1137–1141.

1695 Riesch R, Muschick M, Lindtke D, Villoutreix R, Comeault AA, Farkas TE, Lucek K, Hellen  
1696 E, Soria-Carrasco V, Dennis SR, et al. 2017. Transitions between phases of genomic  
1697 differentiation during stick-insect speciation. *Nat Ecol Evol* **1**: 1–13.

1698 Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK. 1999. Transgressive segregation, adaptation and  
1699 speciation. *Heredity* **83**: 363–372.

1700 Rossi M, Hausmann AE, Thurman TJ, Montgomery SH, Papa R, Jiggins CD, McMillan WO,  
1701 Merrill RM. 2020. Visual mate preference evolution during butterfly speciation is  
1702 linked to neural processing genes. *Nat Commun* **11**: 4763.

1703 Sambatti JBM, Strasburg JL, Ortiz-Barrientos D, Baack EJ, Rieseberg LH. 2012. Reconciling  
1704 extremely strong barriers with high levels of gene exchange in annual sunflowers.  
1705 *Evolution* **66**: 1459–1473.

1706 Savolainen O, Lascoux M, Merilä J. 2013. Ecological genomics of local adaptation. *Nat Rev*  
1707 *Genet* **14**: 807–820.

1708 Schemske DW, Bradshaw HD. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in  
1709 monkeyflowers (*Mimulus*). *Proc Natl Acad Sci* **96**: 11910–11915.

1710 Schumer M, Xu C, Powell DL, Durvasula A, Skov L, Holland C, Blazier JC, Sankararaman  
1711 S, Andolfatto P, Rosenthal GG, et al. 2018. Natural selection interacts with  
1712 recombination to shape the evolution of hybrid genomes. *Science* **360**: 656–660.

1713 Seehausen O, Terai Y, Magalhaes IS, Carleton KL, Mrosso HDJ, Miyagi R, van der Sluijs I,  
1714 Schneider MV, Maan ME, Tachida H, et al. 2008. Speciation through sensory drive in  
1715 cichlid fish. *Nature* **455**: 620–626.

1716 Seeholzer LF, Seppo M, Stern DL, Ruta V. 2018. Evolution of a central neural circuit

- 1717           underlies *Drosophila* mate preferences. *Nature* **559**: 564–569.
- 1718 Selby JP, Willis JH. 2018. Major QTL controls adaptation to serpentine soils in *Mimulus*  
1719           *guttatus*. *Mol Ecol* **27**: 5073–5087.
- 1720 Servedio MR, Doorn GSV, Kopp M, Frame AM, Nosil P. 2011. Magic traits in speciation:  
1721           ‘magic’ but not rare? *Trends Ecol Evol* **26**: 389–397.
- 1722 Shahandeh MP, Turner TL. 2020. The complex genetic architecture of male mate choice  
1723           evolution between *Drosophila* species. *Heredity* **124**: 737–750.
- 1724 Sianta SA, Kay KM. 2021. Parallel evolution of phenological isolation across the speciation  
1725           continuum in serpentine-adapted annual wildflowers. *Proc R Soc B Biol Sci* **288**:  
1726           20203076.
- 1727 Smadja CM, Butlin RK. 2011. A framework for comparing processes of speciation in the  
1728           presence of gene flow. *Mol Ecol* **20**: 5123–5140.
- 1729 Smith SD, Pennell MW, Dunn CW, Edwards SV. 2020. Phylogenetics is the new genetics  
1730           (for most of biodiversity). *Trends Ecol Evol* **35**: 415–425.
- 1731 Sobel J, Streisfeld M. 2013. Flower color as a model system for studies of plant evo-devo.  
1732           *Front Plant Sci* **4**: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00321>.
- 1733 Sobel JM, Chen GF. 2014. Unification of methods for estimating the strength of reproductive  
1734           isolation. *Evolution* **68**: 1511–1522.
- 1735 Sorenson MD, Sefc KM, Payne RB. 2003. Speciation by host switch in brood parasitic  
1736           indigobirds. *Nature* **424**: 928–931.
- 1737 Stankowski S, Chase MA, McIntosh H, Streisfeld MA. 2023. Integrating top-down and  
1738           bottom-up approaches to understand the genetic architecture of speciation across a  
1739           monkeyflower hybrid zone. *Mol Ecol* **in press**: 10.1111/mec.16849.
- 1740 Stankowski S, Streisfeld MA. 2015. Introgressive hybridization facilitates adaptive

1741           divergence in a recent radiation of monkeyflowers. *Proc Biol Sci* **282**: 20151666.

1742 Stern DL, Orgogozo V. 2008. The loci of evolution: how predictable is genetic evolution?

1743           *Evol Int J Org Evol* **62**: 2155–2177.

1744 Stinchcombe JR, Hoekstra HE. 2008. Combining population genomics and quantitative

1745           genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity* **100**:

1746           158–170.

1747 Stracke R, Werber M, Weisshaar B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis*

1748           . *Curr Opin Plant Biol* **4**: 447–456.

1749 Streisfeld MA, Kohn JR. 2007. Environment and pollinator-mediated selection on parapatric

1750           floral races of *Mimulus aurantiacus*. *J Evol Biol* **20**: 122–132.

1751 Streisfeld MA, Rausher MD. 2011. Population genetics, pleiotropy, and the preferential

1752           fixation of mutations during adaptive evolution. *Evolution* **65**: 629–642.

1753 Sundqvist L, Keenan K, Zackrisson M, Prodöhl P, Kleinhans D. 2016. Directional genetic

1754           differentiation and relative migration. *Ecol Evol* **6**: 3461–3475.

1755 The Heliconius Genome Consortium, Dasmahapatra KK, Walters JR, Briscoe AD, Davey

1756           JW, Whibley A, Nadeau NJ, Zimin AV, Hughes DST, Ferguson LC, et al. 2012.

1757           Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among

1758           species. *Nature* **487**: 94–98.

1759 Turbek SP, Browne M, Di Giacomo AS, Kopuchian C, Hochachka WM, Estalles C, Lijtmaer

1760           DA, Tubaro PL, Silveira LF, Lovette IJ, et al. 2021. Rapid speciation via the

1761           evolution of pre-mating isolation in the Iberá seedeater. *Science* **371**: eabc0256.

1762 Unbehend M, Kozak GM, Koutroumpa F, Coates BS, Dekker T, Groot AT, Heckel DG,

1763           Dopman EB. 2021. Bric à brac controls sex pheromone choice by male European corn

1764           borer moths. *Nat Commun* **12**: 2818.

- 1765 Vijay N, Bossu CM, Poelstra JW, Weissensteiner MH, Suh A, Kryukov AP, Wolf JBW.  
1766 2016. Evolution of heterogeneous genome differentiation across multiple contact  
1767 zones in a crow species complex. *Nat Commun* **7**: 13195.
- 1768 Wellenreuther M, Bernatchez L. 2018. Eco-evolutionary genomics of chromosomal  
1769 inversions. *Trends Ecol Evol* **33**: 427–440.
- 1770 Wessinger CA, Hileman LC. 2020. Parallelism in flower evolution and development. *Annu*  
1771 *Rev Ecol Evol Syst* **51**: 387–408.
- 1772 Westram AM, Rafajlović M, Chaube P, Faria R, Larsson T, Panova M, Ravinet M, Blomberg  
1773 A, Mehlig B, Johannesson K, et al. 2018. Clines on the seashore: the genomic  
1774 architecture underlying rapid divergence in the face of gene flow. *Evol Lett* **2**: 297–  
1775 309.
- 1776 Westram AM, Stankowski S, Surendranadh P, Barton N. 2022. What is reproductive  
1777 isolation? *J Evol Biol* **35**: 1143–1164.
- 1778 Widmer A, Lexer C, Cozzolino S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants.  
1779 *Heredity* **102**: 31–38.
- 1780 Wiley C, Ellison CK, Shaw KL. 2011. Widespread genetic linkage of mating signals and  
1781 preferences in the Hawaiian cricket *Laupala*. *Proc R Soc B Biol Sci* **38**:  
1782 rspb20111740-102.
- 1783 Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant*  
1784 *Biol* **5**: 218–223.
- 1785 Xu M, Shaw KL. 2019. Genetic coupling of signal and preference facilitates sexual isolation  
1786 during rapid speciation. *Proc R Soc B Biol Sci* **286**: 20191607.
- 1787 Yang Y, Servedio MR, Richards-Zawacki CL. 2019. Imprinting sets the stage for speciation.  
1788 *Nature* **574**: 99–102.



1789 Yeaman S, Whitlock MC. 2011. The genetic architecture of adaptation under migration–  
1790 selection balance. *Evolution* **65**: 1897–1911.

1791 Yoder JB, Gomez G, Carlson CJ. 2020. Zygomorphic flowers have fewer potential pollinator  
1792 species. *Biol Lett* **16**: 20200307.

1793 Yuan Y-W, Sagawa JM, Young RC, Christensen BJ, Bradshaw HD Jr. 2013. Genetic  
1794 dissection of a major anthocyanin QTL contributing to pollinator-mediated  
1795 reproductive isolation between sister species of *Mimulus*. *Genetics* **194**: 255–263.

1796 Zhao Z, McBride CS. 2020. Evolution of olfactory circuits in insects. *J Comp Physiol A* **206**:  
1797 353–367.

1798

1799

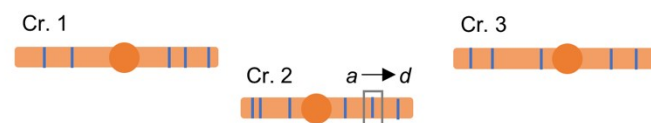
1800 **Glosario**

Aislamiento precigótico	Barreras de aislamiento reproductivo que actúan antes de que la fertilización ocurra.
Arquitectura genética	Para un fenotipo dado, el número, localización, interacciones, modo de acción y tamaño de efecto de los loci subyacentes.
Desequilibrio de ligamiento (DL)	La asociación no aleatoria de alelos en loci diferentes (sin importar su proximidad física).
Ligamiento (físico)	Proximidad física de loci en un cromosoma.
Pleiotropía	Un fenómeno en el cual un alelo afecta múltiples fenotipos.
Mecanismo de un alelo	Cuando el aislamiento reproductivo es fortalecido a través de la sustitución del <i>mismo</i> alelo en dos poblaciones divergentes.
Mecanismo de dos alelos	Cuando el aislamiento reproductivo es fortalecido a través de la sustitución de alelos <i>diferentes</i> en dos poblaciones divergentes.
Modelos de rasgos mágicos	Modelos de especiación que invocan un rasgo bajo selección divergente que también contribuye al apareamiento asortativo.

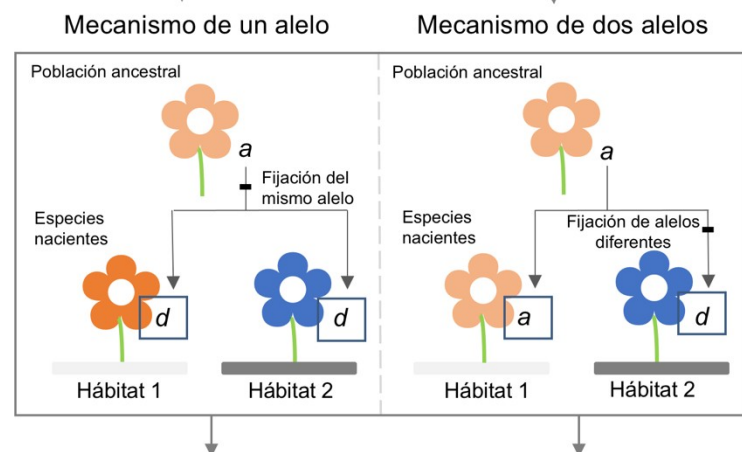
Regla de concordancia de fenotipo	Cuando individuos se reproducen con individuos parecidos basados en la presencia de rasgos que ambos tienen en común.
Regla de rasgo-preferencia (sin concordancia)	Cuando la divergencia coordinada entre los rasgos de machos y hembras es necesaria para que haya apareamiento asortativo.

1801  
1802  
1803

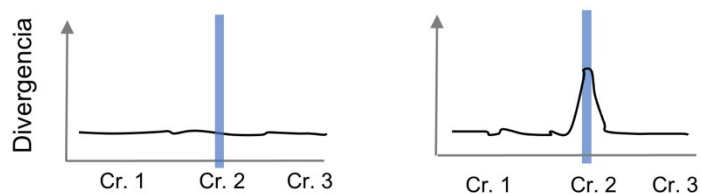
**A** Múltiples loci pueden influenciar las barreras precigóticas.



**B** En cada locus, el aislamiento reproductivo debe evolucionar mediante la sustitución de la misma mutación (un alelo) o mutaciones diferentes (dos alelos) en las dos especies nacientes.



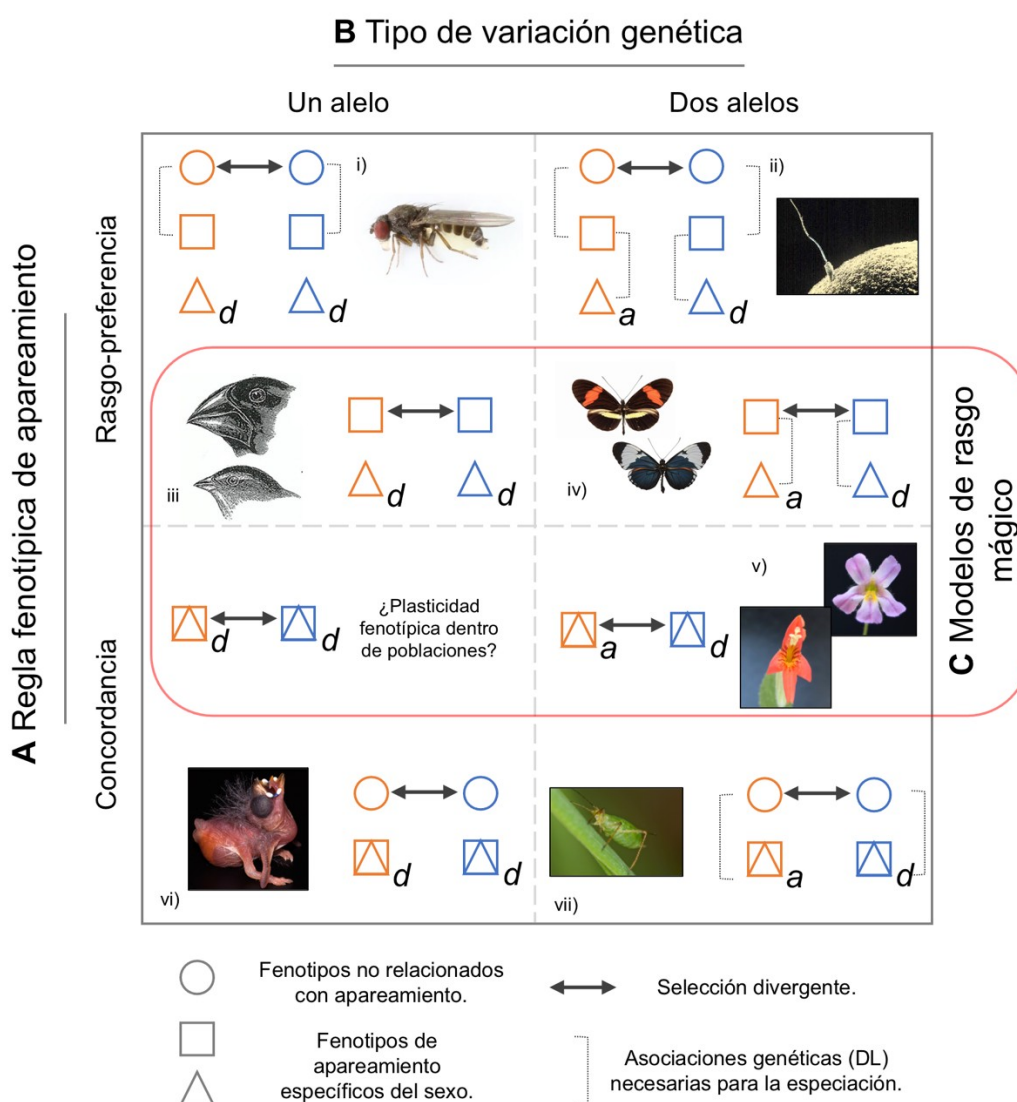
**C** El tipo de variación de un alelo sería difícil de detectar porque no hay variación genética entre las especies nacientes en esos loci.



1804  
1805  
1806  
1807  
1808  
1809  
1810  
1811  
1812  
1813  
1814  
1815  
1816

**Figura 1. A.** Sustituciones en múltiples loci (las cuales pueden influenciar múltiples rasgos fenotípicos) pueden fortalecer el aislamiento precigótico. En cada locus, el alelo a ancestral puede ser reemplazado por la sustitución de un alelo d derivado. **B.** En cada locus, el aislamiento precigótico debe evolucionar mediante la sustitución del mismo alelo ("mecanismo de un alelo") o de alelos diferentes ("mecanismo de dos alelos"). En el ejemplo *hipotético* que se muestra aquí, los alelos de un locus del cromosoma 2 influyen en el color de las flores y causan divergencia en las dos especies nacientes, fortaleciendo así el apareamiento asortativo. Esto puede lograrse mediante la sustitución de los mismos alelos derivados (quizás a través de la evolución de la plasticidad fenotípica inducida por el hábitat), o mediante la fijación del alelo derivado en ambas poblaciones. Se espera que los mecanismos de un alelo faciliten en gran medida la evolución del

1817 aislamiento precigótico, porque no se requiere DL con otros componentes (como la  
 1818 adaptación local). Los mecanismos de uno y dos alelos no son mutuamente excluyentes,  
 1819 y ambos tipos de variación pueden contribuir a las barreras precigóticas, o incluso a los  
 1820 mismos fenotipos. **C.** Aunque la variación alélica de tipo un alelo suele ser más difícil de  
 1821 comprender, los ejemplos son potencialmente extendidos y podrían incluir alelos para  
 1822 una mayor selectividad para elegir pareja, menor migración, impronta más fuerte o  
 1823 menor varianza en el tiempo de floración, entre otros. Sin embargo, nuestra capacidad  
 1824 para detectar este tipo de variación genética puede estar limitada por el enfoque típico  
 1825 en la caracterización de las diferencias entre especies (incluyendo QTL, GWAS, análisis  
 1826 de "escaneos genómicos", etc.). En consecuencia, aunque los mecanismos de un alelo se  
 1827 aceptan ampliamente como la vía más sencilla para reforzar el aislamiento precigótico  
 1828 frente al flujo genético, las pruebas empíricas sólidas siguen siendo limitadas.  
 1829

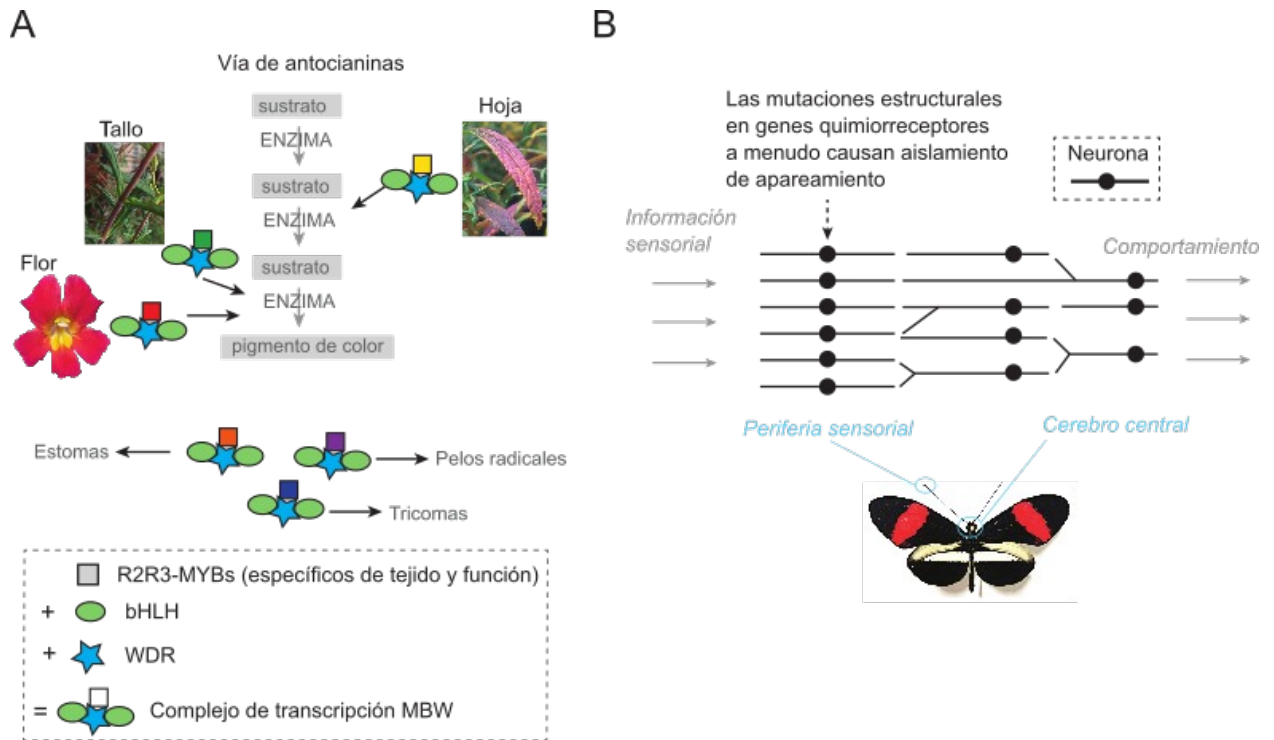


1830 **Figura 2.** Se han propuesto tres clases amplias de modelos conceptuales que reducen el  
 1831 número de asociaciones genéticas (DL) que deben mantenerse para que evolucione el  
 1832 aislamiento precigótico frente al flujo genético. Estos modelos incluyen: **A.** Concordancia  
 1833 de fenotipos, donde el apareamiento asortativo depende de la presencia de rasgos que  
 1834 ambos sexos tienen en común (Kopp et al. 2018); **B.** Mecanismos de un alelo, donde el  
 1835

1836 aislamiento precigótico se ve fortalecido por la sustitución del mismo alelo en las dos  
1837 especies nacies (Felsenstein 1981; Figura 1); y **C.** Modelos de rasgos mágicos, que  
1838 asumen que un rasgo bajo selección divergente también contribuye al apareamiento  
1839 asortativo (Gavrilets 2004). Estos escenarios no se excluyen mutuamente y pueden  
1840 contribuir simultáneamente a la evolución del aislamiento precigótico durante un único  
1841 evento de especiación. Los símbolos representan diferentes fenotipos implicados, donde  
1842 los círculos son rasgos que no están directamente relacionados con el apareamiento  
1843 (sobre los que puede actuar la selección divergente, representada por flechas), y los  
1844 cuadrados y triángulos representan rasgos de apareamiento específicos del sexo (que  
1845 pueden ser uno y el mismo en escenarios concordantes). Los corchetes representan las  
1846 asociaciones genéticas (DL) que deben mantenerse para que evolucione el aislamiento  
1847 precigótico cuando persiste el flujo genético. Suponemos que las sustituciones alélicas (*a*  
1848 para ancestral o *d* para derivado) que evolucionan según un mecanismo de uno o dos  
1849 alelos influyen en uno de los fenotipos específicos del sexo, pero podrían influir  
1850 igualmente en todos los componentes del aislamiento precigótico (es decir: cuadrados,  
1851 triángulos y círculos). A modo de ejemplo: i) Se ha demostrado experimentalmente que  
1852 el mismo alelo refuerza la preferencia femenina por machos coespecíficos en las  
1853 especies hermanas *Drosophila subobscura* y *D. persimulans* (Ortíz-Barrientos y Noor  
1854 2005) (Foto: D. Obbard); ii) Las interacciones entre espermatozoides y óvulos que  
1855 contribuyen al aislamiento postapareamiento precigótico podrían representar un  
1856 escenario de preferencia de rasgos, pero es poco probable que estén sometidas a  
1857 selección divergente directa (Foto: Desconocido vía Wikimedia Commons); iii) La  
1858 selección divergente que actúa sobre la morfología del pico influye en el canto de los  
1859 pinzones de Darwin (Podos 2001), que es aprendido por las hembras. Es concebible que  
1860 los alelos que aumentan la capacidad de aprendizaje puedan propagarse en ambas  
1861 especies, fortaleciendo así el aislamiento reproductivo (Foto: Kammster vía Wikimedia  
1862 Commons); iv) En *Heliconius cydno* y *H. melpomene*, alelos diferentes determinan  
1863 preferencias visuales de apareamiento divergentes para patrones de advertencia  
1864 brillantes, que están bajo selección divergente. En este caso, se sabe que el vínculo  
1865 estrecho entre el patrón alar y los alelos de preferencia ayuda a mantener el DL (Merrill  
1866 et al. 2019) (Foto: G. Gallice vía Wikimedia Commons); v) El color de las flores  
1867 (controlado por diferentes alelos) está bajo selección divergente por parte de los  
1868 polinizadores locales, lo que contribuye simultáneamente al apareamiento asortativo  
1869 (Schemske y Bradshaw 1999) (Foto: KK); vi) Diferentes especies de pinzones parásitos de  
1870 nido *Vidua* han evolucionado una serie de adaptaciones, como la coloración de la boca, lo  
1871 que les permite parasitar nidos de diferentes especies hospederas. Tanto los pichones  
1872 machos como las hembras aprenden el canto de sus padres adoptivos, lo que contribuye  
1873 al apareamiento asortativo (Sorenson et al. 2003). Es concebible que el mismo alelo  
1874 pueda propagarse por distintas especies para reforzar la capacidad de aprendizaje o la  
1875 preferencia por distintos hospederos (Foto de Jamie et al. 2020); vi) Los pulgones del  
1876 guisante se han adaptado a distintas plantas hospederas, en las que se aparean. El DL  
1877 entre alelos para el desempeño y la preferencia se mantienen mediante ligamiento físico  
1878 (Hawthorne y Via 2001) (Foto: A. Murray vía Wikimedia Commons).

1879  
1880  
1881  
1882  
1883  
1884  
1885  
1886  
1887

1888  
1889  
1890  
1891



1892

1893 **Figura 3. A.** En plantas, las transiciones evolutivas en el color de las flores son  
1894 fácilmente causadas por mutaciones en genes que codifican factores de transcripción  
1895 R2R3-MYB. Estas proteínas R2R3-MYB se combinan con una proteína de repetición WD  
1896 (WDR) y al menos dos proteínas de hélice-bucle-hélice básicas (bHLH) para formar  
1897 complejos de transcripción multiproteicos (comúnmente denominados MBW). Los MBW  
1898 regulan múltiples genes que determinan el destino de las células epidérmicas en toda la  
1899 planta, incluidos los genes que codifican enzimas que funcionan en los pasos bioquímicos  
1900 de la síntesis del pigmento antocianina. Existen múltiples copias de R2R3-MYB en el  
1901 genoma de una planta, lo que permite que los complejos de transcripción MBW sean  
1902 específicos de tejido y función y limita los efectos pleiotrópicos deletéreos de las  
1903 mutaciones R2R3-MYB. Por ejemplo, en este diagrama hipotético, tres complejos de  
1904 transcripción MBW diferentes regulan los pigmentos antocínicos en flores, hojas y tallos.  
1905 Los R2R3-MYB están sombreados con diferentes colores para indicar la especificidad en  
1906 la parte de la vía y/o el tejido vegetal blanco. Otros complejos de transcripción MBW,  
1907 aquí con colores que indican diferentes R2R3-MYBs, pueden regular vías que producen  
1908 tricomas (pelos de la planta), pelos radicales de la raíz y estomas. Así, las mutaciones  
1909 que cambian el color de las flores pueden tener efectos limitados en el resto de la planta,  
1910 aunque utilicen un mecanismo común de regulación genética. **B.** Del mismo modo, en los  
1911 animales, se cree que las diferencias en el alcance de la pleiotropía afectan cuáles  
1912 mutaciones influyen en el aislamiento de apareamiento. En los insectos, las mutaciones  
1913 en los quimiorreceptores de la periferia sensorial de los sistemas neuronales podrían ser  
1914 responsables con más frecuencia del aislamiento de apareamiento que las mutaciones  
1915 que afectan las partes centrales del cerebro. En este esquema de una red neuronal, la  
1916 dirección general de la información es de izquierda a derecha, con círculos que indican  
1917 los cuerpos neuronales y líneas que indican sus conexiones. Las neuronas tienden a estar

1918 más interconectadas y realizan cálculos de mayor nivel yendo de la periferia sensorial al  
1919 cerebro central (Fotos de RM y EM).

1920

1921