

La zona híbrida pirenaica de *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae) y el endosimbionte bacteriano *Wolbachia*

Patricia Jiménez-Florido^{1, 2}, Rosario Planelló³, David Buckley^{1, 2}, José L. Bella^{1, 2, *}

¹Departamento de Biología (Genética), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, España.

²Centro de Investigación en Biodiversidad y Cambio Global (CIBC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, España.

³Grupo de Entomología Molecular, Biomarcadores y Estrés Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), 28232, Las Rozas, Madrid, España. bella@uam.es

Introducción

Chorthippus parallelus (Orthoptera; *Pseudochorthippus parallelus* para otros autores) es un acrídido común en Europa Continental y en Inglaterra, donde recibe el nombre de saltamontes de los prados (Figura 1). Durante años, se consideró que en la Península Ibérica estaba reemplazado por la especie endémica *Chorthippus erythropus*, debido a las diferencias morfológicas y comportamentales, como el cortejo, entre

otras, que presentan ambos taxones (Tabla 1). El endemismo ibérico, por otra parte, tiene en la actualidad la distribución correspondiente a su hábitat específico de praderas alpinas, lo que la limita a la región norte de la península (Galicia, Asturias, Cantabria, País Vasco y algunas zonas pirenaicas navarras, aragonesas y catalanas), el Sistema Central, algunos puntos del Sistema Ibérico y una zona muy restringida de Sierra Nevada. Tenemos también evidencia propia de su presencia en ciertas localiza-



Figura 1. Hembra (abajo) y macho (arriba) adultos de *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae) copulando. Obsérvese el dimorfismo sexual: mayor tamaño y ausencia de alas desarrolladas en las hembras. Fuente: Grupo de investigación reconocido “Zonas Híbridas – HyZo” de la Universidad Autónoma de Madrid/Comunidad Autónoma de Madrid <https://www.uam.es/uam/investigacion/grupos-de-investigacion/detalle/f1-531>

ciones del centro y norte de Portugal. Por lo tanto, mientras que en la cornisa cantábrica se asume el flujo génico entre ambos taxones puros, el resto de las localizaciones se consideran aisladas unas de otras.

A su estatus de especies diferentes contribuía que la cordillera pirenaica representa una barrera formidable para estos organismos, cuyo límite altitudinal está en 1800m, por lo que se consideraba que ambos taxones, el del resto del continen-

te europeo y el exclusivo de la Península Ibérica, estaban aislados en términos de reproducción. Esta distribución es característica de muchos animales y plantas que, debido a las glaciaciones cuaternarias, quedaron aisladas en las regiones meridionales del continente que les sirvieron de refugio climático (penínsulas ibérica, itálica y balcánica, por ejemplo). Durante generaciones divergieron genéticamente en alopatría (es decir, separados y aislados geográficamente) para luego recolonizar

Tabla 1. Diferencias principales con valor taxonómico que distinguen a *Chorthippus parallelus parallelus* de *C. p. erythropus* en rasgos morfológicos (columna de la izquierda), y de comportamiento (columna derecha). Recopilado de diversas fuentes.

Diferencias morfológicas	Diferencias comportamentales
Color de las tibias traseras	Canto de cortejo
Número de púas en los peines estriduladores	Canto de llamada
Longitud del fémur posterior	
Longitud del ovopositor	

el continente en sucesivos avances y retrocesos, si bien en ocasiones ya acumulando diferencias muy notables, como es el caso que nos ocupa (Hewitt, 2000).

Esta perspectiva cambia cuando en la década de los 80 del siglo pasado se descubre que, en ciertos puntos muy concretos de los Pirineos en los que la altitud lo permite, se produce el contacto secundario entre ambos taxones, dando lugar a híbridos naturales, viables y fértiles. Es decir, se establece una zona híbrida (ZH)

con varios puntos de contacto (Figura 2). Esto condujo a su reclasificación taxonómica como subespecies: *Chorthippus parallelus parallelus* (Cpp) y *Chorthippus parallelus erythropus* (Cpe), si bien esta modificación es polémica atendiendo a su distribución escasamente solapante, a consideraciones ecológicas, a características cromosómicas, y a diferencias en genes nucleares y mitocondriales que se han puesto de manifiesto desde entonces. Además, la ZH se ha mantenido estable durante más de 30 años de estudio.



Figura 2. Localización de la zona híbrida en Portalet (Pirineos) de *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae): *C. p. erythropus* (Cpe) y *C. p. parallelus* (Cpp). Se han descrito otros puntos de contacto entre ambos taxones en otros valles transversales de los Pirineos (caso de Canfranc, Roncal o Larrau, por ejemplo, así como en su extremo occidental, en el País Vasco), y en los que unen ambas vertientes de los Alpes. Modificado de Funkhouser et al. (2015).

*Esto condujo a su
reclasificación taxonómica
como subespecies: Chorthippus
parallelus parallelus (Cpp)
y Chorthippus parallelus
erythropus (Cpe), si bien esta
modificación es polémica*

En este sentido, es destacable que, si realizamos un transecto, es decir, un muestreo en distintos puntos entre las poblaciones puras a ambos extremos de la ZH, los híbridos naturales muestran clinas características de cada rasgo subespecie-específico analizado (o sea, variaciones graduales a lo largo del área muestreada), mostrando en unos casos su introgresión a lo largo del recorrido, selección a favor o en contra en otros, o su carácter neutro (Gosálvez et al., 1988; Hagberg et al., 2022). Todo ello como resultado de los distintos procesos demográficos y evolutivos, avances y retrocesos que han modelado esta ZH durante las aproximadamente 9000 generaciones (anuales) que se estiman desde su origen (Hewitt, 2000). Esto implica que los híbridos naturales presentan características variables a lo largo del transecto, pareciéndose en mayor o menor medida al taxón puro del que se encuentren, en principio,

más cerca. No obstante, los híbridos F1 entre ambas subespecies obtenidos en el laboratorio obedecen escrupulosamente la “regla de Haldane”, la cual establece que, si un sexo está ausente, es raro o estéril en una población híbrida, entonces ese sexo será el heterogamético (que produce dos tipos distintos de gametos, al igual que los varones humanos). De manera que, en nuestro modelo, mientras que las hembras híbridas F1 son tanto viables como fértiles, los machos F1 (heterogaméticos) se desarrollan con aparente normalidad excepto en lo que se refiere al desarrollo de sus testículos y del proceso meiótico, lo que resulta en su completa esterilidad (Hewitt et al., 1987; Bella et al., 1990).

Por todo ello, durante años se consideró que esta ZH estaba mantenida por un equilibrio entre selección, recombinación y dispersión entre descendientes de los sucesivos cruzamientos después de los primeros retrocruzamientos entre los parentales puros y los primeros híbridos, en los que se habían ido restaurando niveles variables de fertilidad, resultando en la situación clinal actual. Sin embargo, nuestro descubrimiento de que la bacteria endosimbionte *Wolbachia* infecta a estos organismos (Martínez et al., 2009) y, como veremos a continuación, manipula su reproducción e influye de manera importante en la ZH desde su mismo origen,

ha introducido un nuevo y estimulante agente en este interesante modelo evolutivo (Zabal-Aguirre et al., 2014; Martínez-Rodríguez y Bella, 2018).

Antecedentes y primera aproximación al modelo experimental

En la década de 2000 y pese a haber sido descrita considerablemente antes, la alfa-proteobacteria *Wolbachia* se convirtió en un objeto de atención importante, dado que la extensión de su infección y sus efectos sobre la reproducción de los hospedadores pasaron de ser considerados excepcionales, casi anecdóticos, a resultar mucho más comunes y variados de lo esperado (véase Jiménez-Flrido et al., 2025, en el número anterior de esta publicación).

Wolbachia es un endosimbionte obligado de distribución extraordinariamente común entre artrópodos (en especial en insectos) y en algunos nematodos y, por tanto, no tiene vida libre fuera de sus hospedadores. Se caracteriza, además, por

mostrar transmisión materna prácticamente obligada (a través del óvulo materno; el parental masculino generalmente no la transmite), y por inducir alteraciones extraordinarias en la reproducción de muchos de los organismos infectados para favorecer su propia transmisión (Jiménez-Flrido et al., 2025). En este contexto, y dado que los estudios sobre la ZH de *Chorthippus parallelus* (Cp) ya tenían una trayectoria de casi 20 años —en los que se habían abordado aspectos comportamentales, morfológicos, citogenéticos, ecológicos, etc.— pareció no sólo plausible sino muy estimulante indagar la posibilidad de que esta bacteria con “extraordinarias habilidades” jugara algún papel en dicha ZH. De hecho, en aquel momento se empezaba a conjeturar que las barreras reproductivas inducidas por *Wolbachia* pudieran reforzar procesos incipientes de especiación, o incluso promoverlos de manera completa.

Pronto comenzamos a explorar esta hipótesis en nuestro modelo y se comprobó no sólo la infección por *Wolbachia* de este ortóptero en la ZH, sino que además muestra dos cepas de esta bacteria per-

Se comprobó no sólo la infección por Wolbachia de este ortóptero en la ZH, sino que además muestra dos cepas de esta bacteria pertenecientes a los supergrupos B y F

tenecientes a los supergrupos B y F, algo que ahora sabemos que es relativamente común en ortópteros acrididos y que, incluso en nuestro caso, pueden coinfectar a un mismo individuo (Zabal-Aguirre et al., 2010). Por otra parte, determinamos que la infección afecta por igual a ambos sexos y que aparece en diversos tejidos, pero con mayor densidad en las gónadas (Figura 3). De manera muy visual, me-

diante hibridación *in situ* en cortes de tejido, pudimos ver cómo efectivamente en los espermatocitos y según avanza la espermiogénesis, la bacteria se va agrupando en un polo, junto con la mayoría del citoplasma, eliminándose a la vez que él. Así, en los espermatozoides maduros no hay infección, no viaja la bacteria y se evita la transmisión por esta vía (Martínez et al., 2009).

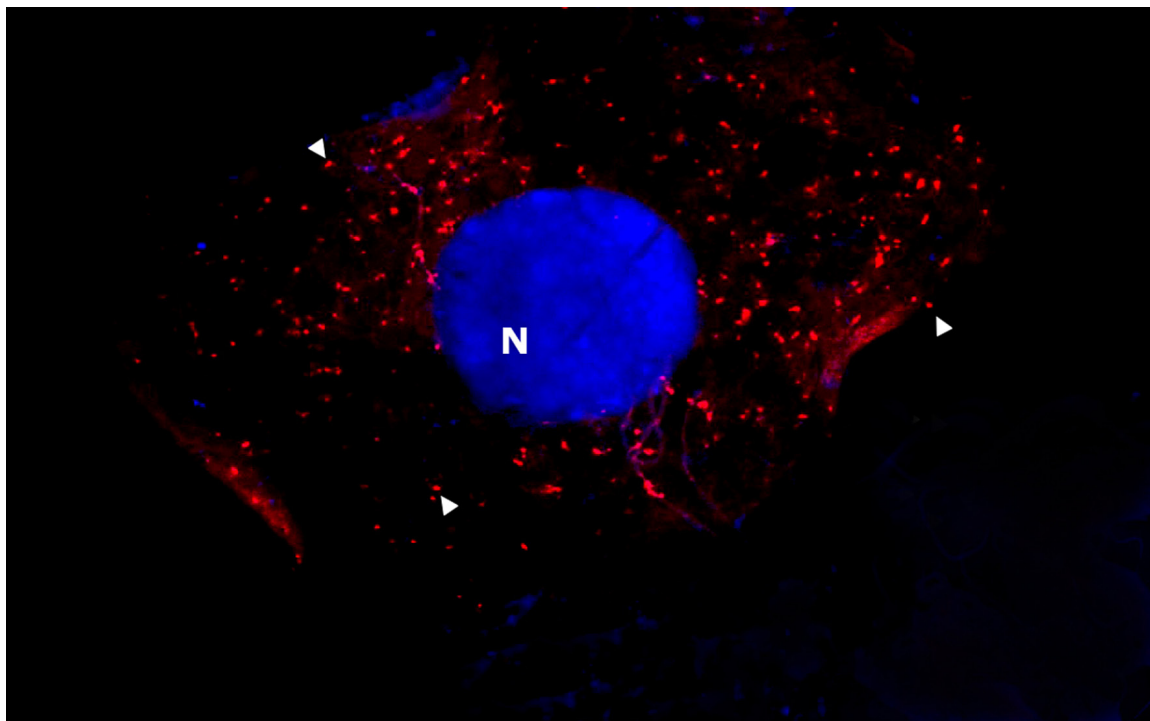


Figura 3. Distribución de *Wolbachia* en una célula de *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae). Se muestra en rojo la infección citoplasmática de *Wolbachia* mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (puntas de flecha como ejemplo). En azul, el núcleo (N). Modificado de Martínez et al. (2009), donde se indican los detalles técnicos.

También, resultó muy excitante constatar que el tipo de infección difiere entre ambas subespecies, así como en sus híbridos naturales, por lo que hay una estructuración sólida de la distribución de los tres tipos de hospedador (Cpp, Cpe y sus híbridos) que solapa con la del tipo de endosimbionte: B, F o coinfectados, correspondiendo esta última categoría curiosamente a dichos híbridos (Zabal-Aguirre *et al.*, 2010). Esto representó un primer apunte señalando la coevolución de cada uno de los genomas bacterianos (B y F) con un tipo de genoma hospedador (Cpe y Cpp, respectivamente) y, curiosamente, la coinfección frecuente de ambas cepas bacterianas en sus híbridos; algo a lo que volveremos más adelante.

El papel de *Wolbachia* en la zona híbrida de *Chorthippus parallelus*, y algunos apuntes sobre la biología de la bacteria

Pronto pudimos comprobar en Cp que, efectivamente, *Wolbachia* induce un fenómeno denominado incompatibilidad citoplasmática (IC). Se trata del efecto reproductivo más frecuente producido por este endosimbionte y provoca que los machos infectados no dejen descendencia (total o parcialmente) si se cruzan con hembras no infectadas o infectadas con otra cepa diferente de la bacteria,

lo que proporciona una ventaja selectiva a las hembras infectadas y fomenta la presencia de *Wolbachia* en la población hospedadora. La infección, por tanto, no sólo supone una barrera reproductiva entre sus hospedadores en la ZH, sino que además esta es de dos tipos y de considerable intensidad, ya que reduce hasta el 32% los descendientes de determinados cruces, influyendo de manera relevante en el mantenimiento y en la dinámica de dicha ZH (Zabal-Aguirre *et al.*, 2014). Estimulados por estos resultados, así como por el modelo de “modificación-rescate” que explica estas IC, abordamos una aproximación citogenética inédita, que nos permitió demostrar cómo efectivamente la bacteria altera químicamente la cromatina de los espermatozoides en los machos infectados (“modificación”). Esto se demuestra por el significativo número de espermátidas aberrantes que presentan (algo que se acrecienta en individuos híbridos entre las dos subespecies de este saltamontes: un efecto sinérgico que muestra de nuevo esa coevolución simbiote/hospedador), y por el incremento significativo que induce la bacteria en el número de quiasmas de estos machos infectados, algo que es difícil de saber si tiene también implicaciones en su variabilidad gamética, es decir, si supone un incremento en la recombinación genética inducida por la propia bacteria (Sarasa *et al.*, 2013). La otra parte del modelo indi-

cado, “rescate” propone que las hembras infectadas, por influencia de la bacteria, son capaces de revertir la “modificación” de los cromosomas de los espermatozoides de los machos infectados.

Sin embargo, la presencia de *Wolbachia* no descarta la infección por otros simbiontes bacterianos con, a su vez, posibles efectos sobre la reproducción de su hospedador. Afortunadamente para nuestros diseños experimentales, pudimos comprobar una baja diversidad bacteriana en las gónadas de este saltamontes: *Spiroplasma* sp. y los dos supergrupos *Wolbachia* descritos previamente por nosotros (B y F) dominan su microbiota gonadal. *Spiroplasma* (clase Mollicutes) es otra conocida bacteria sin vida libre fuera de su hospedador y con ese potencial de inducir alteraciones reproductoras. Ambas bacterias parecen coexistir en algunos Cp, pero no se muestra asociación significativa de *Spiroplasma* con el sexo del saltamontes o con la infección por *Wolbachia*, lo que confirma que esta última es la única infección bacteriana que causa anomalías en la reproducción.

Una observación muy interesante para otros estudios alrededor de *Wolbachia* fue el descubrimiento en nuestro modelo de que la temperatura ambiental puede influir de manera relevante en la proporción de individuos infectados en determinadas

poblaciones expuestas a altas temperaturas durante el ciclo vital del hospedador. Que el calor afecta a la densidad bacteriana en los individuos infectados por *Wolbachia* con un efecto antibiótico es algo conocido desde hace tiempo, pero nosotros pudimos comprobar en poblaciones de Cp del Sistema Central que, a lo largo del verano, esta proporción de individuos infectados se reduce considerablemente, lo que se asocia también significativamente con el incremento de las altas temperaturas a lo largo de la estación. Sin embargo,

Hay segmentos del genoma bacteriano insertados en los cromosomas de Cp

esto no ocurre en poblaciones pirenaicas donde las temperaturas máximas no alcanzan los mismos valores; en estos otros enclaves, la proporción de individuos infectados en la población se mantiene a lo largo del verano (periodo vital de estos organismos). Esto quiere decir que la dinámica de la infección y, sobre todo, sus posibles efectos sobre la reproducción del hospedador pueden ser diferentes en unas poblaciones y en otras y, de manera interesante, los cruzamientos que se realicen en regiones más cálidas al comienzo de la temporada reproductiva cuando la proporción de infectados/as es más alta, rendirán resultados diferentes en cuanto

al número de descendientes, transmisión de la bacteria, etc., con respecto a aquellos que tengan lugar al final (con menos infectados en la población) (Martínez-Rodríguez et al., 2014).

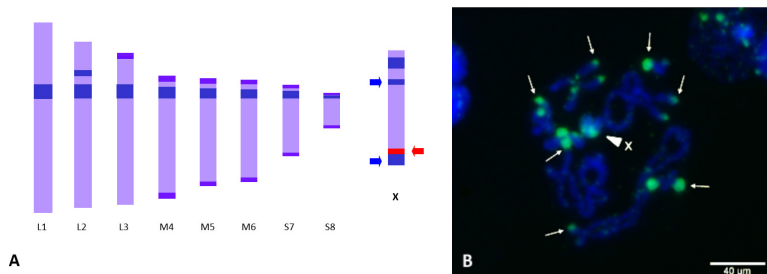
Todo ello no solo es relevante para nuestra ZH y para la biología en general de *Wolbachia*, sino también en el caso de sus posibles aplicaciones como agente biológico en la lucha frente a ciertas plagas y enfermedades (Jiménez-Florido et al., 2025). En este último sentido, cabe destacar también otra aportación de nuestro sistema que se desprende de la observación de series consecutivas interanuales de las frecuencias de infección en nuestras poblaciones. La conclusión es que las cepas B y F de *Wolbachia*, al menos en nuestro modelo, muestran un patrón temporal de variación en su frecuencia compatible con un mecanismo de selección natural negativo dependiente de la frecuencia, en el que la aptitud biológica de los individuos infectados con una cepa determinada disminuye proporcionalmente cuanto más frecuentes son en una población. Ahora bien, es difícil establecer qué proceso o procesos mantienen en nuestras poblaciones estas oscilaciones periódicas y predecibles (Martínez-Rodríguez et al., 2019).

Por otro lado, otra contribución relevante de nuestro modelo a la biología de

Wolbachia ha sido la constatación de que hay segmentos del genoma bacteriano insertados en los cromosomas de Cp (Figura 4). Es importante señalar que estas inserciones, que no son despreciables ni en número ni tamaño, aparecen tanto en individuos infectados como en los no infectados por la bacteria. Es decir, son ancestrales, ya inherentes al propio genoma del saltamontes y han ocurrido a lo largo de generaciones de convivencia, de coevolución, entre el endosimbionte y su hospedador. Si bien ya había alguna evidencia similar anterior, en nuestro caso hemos podido constatar que, a la vez que los fragmentos de genoma bacteriano, se han transferido unidades completas del genoma de un virus bacteriófago específico de *Wolbachia* (el virus WO). Así mismo, hemos rastreado y localizado de manera inédita estas inserciones físicamente en los cromosomas del saltamontes mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La gran pregunta es si estas inserciones (bacterianas y/o víricas) se expresan en algún tejido o circunstancia concreta, además de si se deben considerar exclusivamente como restos históricos (“arqueológicos”) de esta larga relación simbiótica, o si pueden tener un significado adaptativo (Funkhouser-Jones et al., 2015).

Un análisis filogenético de secuencias del gen ribosómico 16S del genoma de *Wolbachia* y la secuenciación de otros 6

Figura 4. (A) Idiograma que muestra el cariotipo de *Chorthippus parallelus* (Orthoptera: Acrididae) compuesto por 8 parejas de autosomas más un cromosoma sexual (X) en el caso de los machos ($2n=17$), y dos X en el de las hembras ($2n=18$).



L = tamaño grande; M = mediano y S = pequeño. La heterocromatina constitutiva, en ocasiones polimórfica para presencia/ausencia y tamaño, se resalta en azul oscuro como bandas (la más prominente en cada cromosoma, indica la posición del centrómero). Ambas subespecies comparten un cariotipo muy similar que difiere fundamentalmente por la presencia en el cromosoma X de una banda de heterocromatina intersticial exclusiva de Cpe, sustituida por una banda distal, telomérica, propia únicamente de Cpp (flechas azules). En esta última subespecie, además, aparecen genes repetidos de ADN ribosómico asociados a esa heterocromatina distal del cromosoma X (flecha roja). **(B) Inserciones ancestrales de fragmentos del genoma del endosimbionte bacteriano *Wolbachia* en los cromosomas meióticos del saltamontes (puntos luminosos indicados con flechas).** Las inserciones de *Wolbachia* en el genoma de *C. parallelus* (flechas) se han puesto de manifiesto mediante hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) en individuos no infectados por la bacteria. Se indica la posición del cromosoma X. Modificado de Funkhouser *et al.* (2015), en donde se indican los detalles técnicos.

de sus genes (*coxa*, *fbpa*, *ftsZ*, *gatB*, *hcpA* y *wsp*) en 127 individuos de Cp de 21 poblaciones dentro y fuera de la ZH siguiendo el sistema de Tipificación Multi-locus de Secuencias (MLST), que se utilizó originalmente en la clasificación clínica de infecciones bacterianas en humanos, confirmó que Cp está infectado por al menos cuatro cepas del supergrupo F y dos del supergrupo B. Pero, lo que es más importante, ha servido para demostrar que la infección está presente desde el mismo

origen de la ZH, es decir, desde el contacto secundario entre las dos subespecies que divergieron separadas, en alopatria (unas en la Península Ibérica, y otras en otros refugios templados de Europa durante la glaciación, como ya se ha indicado). La infección ya estaba presente en las poblaciones ancestrales lo que implica que, muy posiblemente, la barrera reproductiva que induce esta infección ha determinado y modela su dinámica desde su inicio. Por otra parte, el descubrimiento

*El descubrimiento de que aparecen bacterias recombinantes entre ambas cepas exclusivamente en los saltamontes híbridos de la ZH, nos ha llevado a proponer la existencia de dos zonas híbridas solapantes: una de *Wolbachia* y la otra, la propia ZH del saltamontes descrita*

de que aparecen bacterias recombinantes entre ambas cepas exclusivamente en los saltamontes híbridos de la ZH (pese a que la coinfección por ambas cepas no es exclusiva de ellos), nos ha llevado a proponer la existencia de dos zonas híbridas solapantes: una de *Wolbachia* que representa la primera ZH bacteriana descrita, y que se manifiesta en una cepa característica de cada subespecie de Cp (Cpp y Cpe; B y F, respectivamente), además de los recombinantes bacterianos híbridos, exclusivos a su vez de los híbridos de ambas subespecies de Cp, y la otra, la propia ZH del saltamontes descrita y analizada en primera instancia a lo largo de estos años. Esto, de nuevo, representa un extraordinario ejemplo de coevolución entre todos estos taxones implicados, y a lo largo de miles de generaciones (Martínez-Rodríguez y Bella, 2018).

Wolbachia* influye en la expresión génica de *Chorthippus parallelus

En la actualidad, nuestros estudios se aproximan a la influencia del endosimbionte en la expresión de los genes de su hospedador. En este sentido, y mediante análisis por qPCR del transcriptoma anotado para estos efectos, hemos apreciado diferencias significativas en la expresión de genes involucrados en rutas esenciales para el valor adaptativo de los individuos infectados, como es el caso del metabolismo energético, el sistema inmune o la reproducción. Hay que señalar que algunas de estas diferencias están significativamente vinculadas al sexo del hospedador, siendo las hembras las que presentan una mayor alteración en la actividad transcripcional de los genes analizados debido a la infección (Jiménez-Flórido et al., 2024).

Hemos apreciado diferencias significativas en la expresión de genes involucrados en rutas esenciales para el valor adaptativo de los individuos infectados

Además, otros análisis todavía preliminares nos indican que la bacteria tiene un efecto relevante en el epigenoma de los individuos de Cpp que infecta, medido en términos del nivel de metilación global del ADN. Algo que, a su vez, se muestra de manera diferente no ya entre individuos infectados y no infectados, sino también entre los infectados de distinto sexo.

Sin duda, la ZH de Cp y su relación endosimbionte con *Wolbachia* aún tienen que aportar información muy relevante sobre el papel de esta bacteria como barrera reproductora en este modelo evolutivo para el estudio de procesos incipientes de especiación, así como sobre la propia biología de los organismos implicados en ella.

Conclusiones

- El ortóptero *Chorthippus parallelus* ha resultado ser un muy buen modelo para el estudio de la biología funcional y evolutiva de *Wolbachia*, y ofrece resultados relevantes en ámbitos tan amplios como la citogenética, los modelos poblacionales o la interacción de

la bacteria con la expresión génica del saltamontes, entre otros aspectos.

- Además, la zona híbrida pirenaica de Cp es única por su naturaleza doble, una zona híbrida entre dos subespecies de este saltamontes (Cpe y Cpp), por un lado, y entre cepas de *Wolbachia*, por otro, en donde a su vez el endosimbionte representa una importante barrera reproductiva, lo que confiere un interés especial a este conocido modelo en biología evolutiva.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Ricardo Pereira, *Stuttgart Natural History Museum*, y a la Dra. Marta Novo, Universidad Complutense de Madrid su ayuda con los análisis de expresión génica. Nuestro grupo está financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad español (MINECO), a través del proyecto I+D+i PID2019-104952GB-I00. Patricia Jiménez-Florido disfruta el contrato de Formación del Profesorado Universitario (FPU) 22/02220 del Ministerio español de Ciencia, Innovación y Universidades.

Referencias

- Bella, J.L., Hewitt, G.M. y Gosálvez, J. 1990. Meiotic imbalance in laboratory-produced hybrid males of *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus*. *Genetics Research*, 56: 43–48.
- Funkhouser-Jones, L.J., Sehner, S.R., Martínez-Rodríguez, P. et al. 2015. *Wolbachia* co-infection in a hybrid zone: discovery of horizontal gene transfers from two *Wolbachia* supergroups into an animal genome. *PeerJ*, 3: e1479.
- Gosálvez, J., López-Fernández, C., Bella, J.L. et al. 1988. A hybrid zone between *Chorthippus parallelus parallelus* and *Chorthippus parallelus erythropus* (Orthoptera: Acrididae): chromosomal differentiation. *Genome*, 30: 656–663.
- Hagberg, L., Celemín, E., Irisarri, I. et al. 2022. Extensive introgression at late stages of species formation: Insights from grasshopper hybrid zones. *Molecular Ecology*, 31: 2384–2399.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789): 907–913.
- Hewitt, G., Butlin, R.K. y East, T.M. 1987. Testicular dysfunction in hybrids between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 31: 25–34.
- Jiménez-Flórido, P., Aquilino, M., Buckley, D. et al. 2024. Differential gene expression in *Chorthippus parallelus* (Zetterstedt, 1821) (Orthoptera: Acrididae: Gomphocerinae) induced by *Wolbachia* infection. *Insect Science*, Nov 29. E-pub ahead of print.
- Jiménez-Flórido, P., Planelló, R., Buckley, D. et al. 2025. La relación endosimbiótica entre la bacteria *Wolbachia* y los artrópodos. *eVOLUCIÓN*, 20(1): 31–45.
- Martínez, P., Del Castillo, P. y Bella, J.L. 2009. Cytological detection of *Wolbachia* in squashed and paraffin-embedded insect tissues. *Biotechnic & Histochemistry*, 84: 347–353.
- Martínez-Rodríguez, P. y Bella, J.L. 2018. *Chorthippus parallelus* and *Wolbachia*: Overlapping orthopteroid and bacterial hybrid zones. *Frontiers in Genetics*, 9: 604.
- Martínez-Rodríguez, P., Granero-Belinchón, R., Arroyo-Yebras, F. et al. 2014. New insight into *Wolbachia* epidemiology: its varying incidence during the host life cycle can alter bacteria spread. *Bulletin of Mathematical Biology*, 76: 2646–2663.
- Martínez-Rodríguez, P., Rolán-Alvarez, E., del Mar Pérez-Ruiz, M. et al. 2019. Geographic and temporal variation of distinct intracellular endosymbiont strains of *Wolbachia* sp. in the grasshopper *Chorthippus parallelus*: a frequency-dependent mechanism? *Microbial Ecology*, 77: 1036–1047.
- Sarasa, J., Bernal, A., Fernández-Calvín, B. et al. 2013. *Wolbachia* induced cytogenetical effects as evidenced in *Chorthippus parallelus* (Orthoptera). *Cytogenetic and Genome Research*, 139: 36–43.
- Zabal-Aguirre, M., Arroyo, F. y Bella, J.L. 2010. Distribution of *Wolbachia* infection in *Chorthippus parallelus* populations within and beyond a Pyrenean hybrid zone. *Heredity*, 104: 174–184.
- Zabal-Aguirre, M., Arroyo, F., García Hurtado, J. et al. 2014. *Wolbachia* effects in natural populations of *Chorthippus parallelus* from the Pyrenean hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology*, 27: 1136–1148.