

エゾオオマルハナバチにおける マイクロサテライト DNA ツールキット

平成 27 年 5 月 25 日受付

高橋 純一^{1,2)}

野村 哲郎^{1,2)}

¹⁾ 京都産業大学総合生命科学部

²⁾ 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター

要 旨

ミツバチ科マルハナバチに属するエゾオオマルハナバチ *Bombus hypocrita sapporoensis* は、特定外来種であるセイヨウオオマルハナバチの代替花粉交配用昆虫として注目されている。今回我われは、本種の農業利用を進めるための遺伝育種学的解析に必要なマイクロサテライト DNA マーカーの適用性を検討した。120 種類のマーカーのうち、57 種類が多型解析に利用できることがわかった。さらに 8 種類のプライマーは、マルチプレックス PCR による同時解析が可能であることを明らかにした。これらのツールキットを利用して女王蜂の受精嚢内から単離した精子 DNA の解析を行ったところ、交配雄蜂の遺伝子型を特定できることがわかった。

キーワード：エゾオオマルハナバチ、マイクロサテライト DNA、マルチプレックス PCR、受精嚢内 PCR、マルハナバチ

1. はじめに

ミツバチ科マルハナバチ属に位置するマルハナバチ類は、花蜜を分泌しない植物種の花にも訪花する性質を持つ花粉媒介能力の高い昆虫である [1]。19 世紀後半には、コロニーを室内で大量増殖することを目的とした飼育に関する研究が行われた [2]。1987 年には、ベルギーで室内累代飼育方法が確立され、トマトのハウス栽培作物の受粉昆虫（ポリネーター）として室内増殖されたセイヨウオオマルハナバチ *Bombus terrestris* L. のコロニーが利用されるようになった [3,4]。日本でも、ヨーロッパ原産のセイヨウオオマルハナバチが 1991 年に導入され、トマトでの有効性が確認されたため、1992 年から本格的にハウス栽培用トマトのポリネーターとして輸入されるようになった [4]。セイヨウオオマルハナバチが利用されるようになると、国内各地でハウスから逃げ出した個体が見つかるようになり、北海道では 1996 年に初めて野

生巣が見つまっている [5]。北海道に帰化したセイヨウオオマルハナバチは、近縁の在来マルハナバチ類や送粉生態系に影響を与えることが危惧されたため、2006年9月1日に特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律（外来生物法）により特定外来生物に指定され、現在はその利用が制限されている。しかし、その後も北海道では、年々分布範囲は拡大しており、地域によっては優占種となっていることが確認されている [6]。マルハナバチ類は、多くの植物の花粉媒介者であるため、生態系の中で重要な役割を果たしているため外来マルハナバチの増加と在来マルハナバチ類の減少は、在来の植物相にも影響を及ぼすことが危惧されている [5]。

我われのグループは、セイヨウオオマルハナバチに替わるポリネーターとして北海道在来のエゾオオマルハナバチ *B. hypocrita sapporoensis* Cockerell に着目し、高受粉系統の育種を進めている。しかし、遺伝子情報に基づいた DNA 育種を行うための遺伝マーカーが本種では少ないことから、マルハナバチ類で利用されているマイクロサテライト DNA マーカーによる解析の検討を行った。

材料および方法

多型解析用 DNA サンプルの調整と PCR テスト

DNA 抽出には、北海道根室市および中標津町で採集したエゾオオマルハナバチの雄蜂 20 個体とした。DNA 抽出は胸部飛翔筋から約 20 mg を摘出して使用した。DNA 抽出キット DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社製) を用いて抽出した。抽出方法は、1.5 ml マイクロチューブにサンプルを入れ、ホモジナイザーを用いてすり潰した。1.5 ml マイクロチューブに ATL buffer 180 μ l を加え、さらに Proteinase K 溶液を 20 μ l 加えた。ボルテックスミキサーを用いて 10 秒攪拌し、数秒間スピンドウンした。その後インキュベーター (55 $^{\circ}$ C) で 1 日培養した。培養後 AL buffer 200 μ l を加え 10 秒攪拌し、数秒間スピンドウン後インキュベーター (70 $^{\circ}$ C) で 10 分間培養した。培養後、99%エタノール 200 μ l を加え、30 秒間攪拌し、数秒間スピンドウンした。QIAamp spin column を 2 ml collection tube に立て、マイクロチューブ内の全ての溶液を spin column の外側に溶液が漏れないよう 2 回に分け入れた。蓋を閉め、遠心機で 4 $^{\circ}$ C 8000 rpm 1 分間の条件で遠心した。遠心後 collection tube の中の液を捨て、キムタオルの上で軽く叩き水滴をできる限り取った。spin column の水滴を取った collection tube に立て、500 μ l の AW1 buffer を加えた。蓋を閉め、8000 rpm で 1 分間の条件で遠心した。遠心後同様にキムタオルで水滴を取った後、500 μ l の AW2 buffer を加え、15000 rpm で 3 分間の条件で遠心した。遠心後 collection tube の中の溶液を捨て、何も加えずに空の状態にして 15000 rpm で 1 分間の条件で遠心した。遠心後 collection tube は捨て、spin column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに立て 20 μ l の AE buffer を加え 1 分間

室温で放置し DNA を溶出した。8000 rpm で 1 分間の条件で遠心して DNA を回収し、 -20°C で保存した。

PCR プライマーの適用性の検討は、マルハナバチ属で開発された 120 種類のプライマー [7,8] を利用して条件の最適化を行った。PCR は、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice によるグラジエント PCR を行った。各プライマーの最適アニーリング温度は、PCR 産物をアガロース電気泳動により確認し、設定温度と照らし合わせることで決定した。各プライマーに対して 0.2 ml のチューブを使用して 12 サンプルを用意した。1 サンプル当たりの反応液量は、DNA 溶液 0.31 μl 、プライマー各 0.15 μl 、 $10\times r$ Taq Buffer 1.50 μl 、dNTP Mixture 1.20 μl 、TaKaRa *r* Taq (タカラバイオ社製) 0.08 μl および滅菌蒸留水 11.60 μl を混合し全体で 15 μl としたものを反応溶液とした。各試薬の反応温度条件は、 94°C で 3 分間の熱変性後、 94°C で 30 秒間、各プライマー当たり 12 種類の温度 (40, 41, 42, 44, 46.4, 48.8, 51.2, 53.6, 56, 58, 59, 60°C) で 30 秒間、 72°C で 30 秒間を 35 サイクル繰り返し、 72°C で 7 分間の伸長反応を行った。100 ml の $1\times\text{TBE}$ 溶液に対して 1.2 g のアガロース (Genetics) を加えた 1.2% アガロースゲルを作成し、1 μl の Midori Green Direct (Genetics) と 5 μl のグラジエント PCR 産物をピペッティングした合計 6 μl をアプライした。その後 100 V、15 分の条件で電気泳動を行い、紫外線照射撮影した電気泳動図から最も鮮明なバンドを選別し、設定温度と照らし合わせ、各プライマーに対して理想の温度を決定した。グラジエント PCR により決定した最適温度条件下で、DNA マイクロサテライト領域を増幅させた。PCR 増幅産物の多型を解析するため、各プライマーに対して 20 個体ずつ自動電気泳動装置 QIAxcel (QIAGEN) を用いて行い、PCR 増幅産物のサイズの測定を行った。

マルチプレックス PCR による遺伝子型判定法の確立

マルチプレックス用プライマーは、PCR による増幅サイズが重複しないこと、プライマーダイマーの形成の可能性がないこと、 T_m 値が類似していること等を考慮して、上記実験により多型頻度が高いアレル座のプライマーから順に増幅が干渉しない組み合わせを対戦形式で計画し、PCR による試験を順次行った。PCR は、MightyAmp genotyping kit (Takara) を使用した。PCR の温度条件は、 98°C で 2 分間の熱変性後、 98°C で 10 秒間、12 種類の温度 (40, 41, 42, 44, 46, 48, 51, 53, 56, 58, 59, 60°C) で 15 秒間、 68°C で 30 秒間を 35–45 サイクル繰り返し、 68°C で 5 分間の伸長反応を行った。100 ml の $1\times\text{TBE}$ 溶液に対して 1.2 g のアガロースを加えた 1.2% アガロースゲルを作成し、1 μl の Midori Green Direct と 5 μl のグラジエント PCR 産物をピペッティングした合計 6 μl をアプライした。その後 100 V、15 分の条件で電気泳動を行い、紫外線照射撮影した電気泳動図からバンドの有無を確認した。次に増幅したプライマーセットは、自動電気泳動装置 QIAxcel を用いて PCR 増幅産物のサイズの簡易測定と最もバンドが鮮明に増幅されているアニーリング温度条件を決定した。全てのア

レル座の増幅が確認されたプライマーセットを選択し、蛍光プライマーを利用して最適な条件で PCR を行い、ABI 3130xl Genetic Analyzer (Lifetechnologies) による遺伝子型判定を行った。

女王蜂受精嚢内精子の遺伝子型解析

北海道各地で採集した 10 個体の女王蜂は、解剖まで 99%エタノールで保存した。受精嚢内精子を取り出すための解剖は、女王蜂を実体顕微鏡下で解剖皿におき 1×PBS 緩衝液中で行った。受精嚢内精子は、解剖ハサミで腹部を開腹後にメスで受精嚢を切開したあと、ピンセットで精子塊を回収し、Lysis バッファー (Takara) に保存した。DNA 抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて上記を同じ条件で、女王蜂とその精子から抽出した。PCR の温度条件は、上記蛍光プライマーを利用して同じ条件で 1 アレル座での PCR を行い、自動シーケンサー ABI 3130xl Genetic Analyzer により遺伝子型判定を行った。

結果および考察

マルハナバチ属で開発されたマイクロサテライト DNA マーカーの各遺伝子座の解析結果を表 1 に示した。表 1 では、エゾオオマルハナバチで PCR 増幅に成功し、グラジエント PCR により決定したアニーリングの最適温度と、QIAxcel により特定したアレルサイズ範囲を示している。今回 120 種類のマイクロサテライト DNA マーカーを試験した結果、57 個のマイクロサテライト DNA マーカーが適用できることが示された。57 種類のマーカー数は、集団遺伝学、遺伝育種学、分子生態学といった各種分野で本種の遺伝子解析を行う上で十分なマーカー数が存在することが今回初めて明らかになった。

今回多型が確認された 57 種類のプライマーの中から 20 種類のマルチプレックス PCR 用プライマーセットの組み合わせを試験したところ、そのうち 1 種類の組み合わせが 5 回の反復試験で再現性を確認することができた (図 1a)。このマルチプレックス PCR 用プライマーセットを表 2 に示した。今回エゾオオマルハナバチでは初めて 1 回のマルチプレックス PCR により 8 個のアレル座における遺伝子型を判定することができるようになった。この結果により遺伝子型解析の簡略化が可能になった。

女王蜂とその受精嚢内精子の遺伝子型を解析した結果を図 1 に示した。解析した 10 個体は、受精嚢内精子由来の DNA 中にはいずれもハプロタイプ (ホモ) 型を示し、女王蜂の遺伝子型とは一致しなかった (図 1b)。今回の解析では、女王蜂由来の遺伝子の混入は見られなかったことから、精子由来 DNA の遺伝子型のみを特定することができた。

我われはエゾオオマルハナバチにおいて 57 種の利用可能なプライマーを見つけることができた。さらにエゾオオマルハナバチで利用することができる 2 種類の遺伝子型解析手法を開

表 1 エゾオオマルハナバチにおけるマイクロサテライト DNA プライマーの増幅結果

アレル座	Primer sequence (5'-3')	サイズ範囲 (bp)	Tm (°C)	増幅*
BTMS0057	F-TGCTTGAACCGAAATAGAGGG	96-126	60	+
	R-CACCGGCATTTTACACACCA			
BTMS0060	F-CGACCACCGGCGCTCCC	215-314	60	+
	R-CCTTCGTCATCGGCACGCAC			
BTMS0065	F-CATTAACGCGATCGTAGCCG	212-242	50	+
	R-TAACGAACAGCCGGTGAGAT			
BTMS0035	F-CGACGTCGAAGAAAATTGTG	232-272	60	+
	R-GCGAGATTTCCAGACACGA			
BTMS0036	F-TTCAACGCACTCTGTAGTCG	200-248	57	+
	R-CACCGGACTTCGTAATCCAC			
BTMS0044	F-AGGATCGAGAGAACGAGCTG	273-297	60	+
	R-AGGCCTTGGGAGAGTTCG			
BTMS0045	F-GAAATTCCCCACGAAATACG	236-287	60	+
	R-GCGGATACAGTTTCGAGCAT			
BTMS0047	F-TATAGGGTGACCCAGAGTGC	124-148	60	+
	R-CCACAAACAGAGCACGAAAGT			
BTMS0048	F-TTCGCGTTTCATTCTGCCAT	144-172	57	+
	R-TGAAGCGTATTGAAGCGACG			
BTMS0062	F-CTGTCGCATTATTCGCGGTT	259-299	60	+
	R-CTGGGCGTGATTCGATGAAC			
BTMS0063	F-GTATCATGCTTTGCCGCACT	121-134	60	+
	R-GGTAGACAATGGAACACGGG			
BTMS0066	F-CATGATGACACCACCAACG	120-174	60	+
	R-TTAACGCCCAATGCCTTTCC			
BTMS0082	F-TCGCGATCTTGGTGATAATGA	381-402	60	+
	R-TCAGACAGAACTGTGAAAAAC			
BTMS0083	F-CGACTCGTTCGAGCGAAATTA	288-324	60	-
	R-GTTTTTGCCAGGCTCCGAAT			
BTMS0114	F-CCATCCGTGATCTTATCGTCG	137-179	50	-
	R-GAAACGTTACGCGTTATTCGG			
BTMS0119	F-GTGCGAGCTTCTCGAGGATA	334-372	60	-
	R-GCGCATGCATAAGTCTCGTT			
BTMS0056	F-GCGTCGACATCGCTAATCTG	271-297	60	-
	R-TCCGGCCGTAATTGGTAGAG			
BTMS0113	F-GGGGATGAACGTCGGTTAGA	336-375	57	+
	R-ATCGTCGAGTTGGGTGAAAA			
BTMS0064	F-AAGCAGCGAAACAGAAGCTC	253-293	57	+
	R-CGGCATCGCCTTCTTCTTTT			
BTMS0043	F-GCCCAAAGATCGTGTCGTAT	138-175	50	+
	R-CTCGCGTTTTCTCCTAGTGG			
BTMS0104	F-TCCTCTGTTTCAGCACACGAT	271-292	50	-
	R-TTCGAAGCCTCGATGTCGT			

表 1 (続き)

アレル座	Primer sequence (5'-3')	サイズ範囲 (bp)	Tm (°C)	増幅*
BTMS0124	F-CGCCGTAATGTAACTCC	242-324	54	+
	R-ACTCAATCCAAACGCCACC			
BTMS0059	F-GGCTAGGAAAGATTAGCACTACC	341-361	60	+
	R-AGTTCGACAGACCAAGCTGT			
BTMS0125	F-TTCGGTGGTAAAAGGAAAGCG	101-135	54	+
	R-CAGAAGGAGCGTTAGGACACAAAC			
BTMS0061	F-CCGAGGATCTCTAGTAGCCG	209-264	60	+
	R-AGCGCATGCTATTACGATCT			
BTMS0071	F-CGCGTAAATTATTCCTCCCTCCC	213-240	57	+
	R-CCATCTCGCGCAGAATGTTT			
BTMS0109	F-AGCTACCACCGAATCGAGAC	134-178	55	+
	R-TCGTATTTCTCCACCGAACGA			
BTMS0126	F-GGTGATCGCTTAAAGCTC	164-190	50	+
	R-GCCAACTACGTTCAATATCG			
BTMS0132	F-TCTGTCTCGTTAGACGCATACG	103-135	57	+
	R-GGAGCAACAAACCCTGAAAGC			
BTMS0136	F-GCATTGCGGTATTGCGTTCCTTTAG	155-185	51	+
	R-CGTTTATCTGCTTCTCTCGTTCG			
BTMS0141	F-CCACATCCTCCAACCTCCTTTC	91-173	54	+
	R-GCGAGAGAATGAATGGTAGAACCG			
BTMS0152	F-ACTTTTATTGTCGGTTCCTTG	166-200	52	-
	R-GGGATATAGTGAACCAGAAA			
BTMS0139	F-CGCTCGCTCAGAAAACCTTTC	124-156	55	+
	R-CGACGAGAAAAAATCGGTCTCAAG			
BTMS0069	F-GATGCGAGATAAAGCGTCGG	198-254	55	+
	R-GACAAAGCAGCCATCTCCAC			
BTMS0133	F-CCACTCATA CGCATTGTGAAG	114-146	51	+
	R-GGACTGAAATTGCCACTATAAGC			
BTMS0127	F-TGACTCTCGACGATTACG	207-237	51	+
	R-ACGCTTAAACTCGCATCG			
BTMS0148	F-CTCTTTTGTTCCTCGTGCT	213-267	52	+
	R-TGCATAAAATGTTACAGTGC			
BTMS0128	F-GATTTCCGATT CAGCCCTGC	179-208	55	+
	R-TTATGCGACGATTCCCCTGG			
BTMS0153	F-ATTTCTGATGACCGACTAAA	241-273	52	+
	R-TATTCCTGATCAGCGTTAAG			
BTMS0150	F-CATTTCCATTCTTAATCT	223-249	51	+
	R-CTGCAATTGACGTATTGTAA			
BT11	F-AAGAGAGAGACAGAGAGATAGGG	128-140	52	+
	R-GCGTTT GACGATTAGATTAGAGCC			
BT28	F-TTGCTGACGTTGCTGTGACTGAGG	181-196	53	+
	R-TCCTCTGTGTTCCTTACTTGGC			

表 1 (続き)

アレル座	Primer sequence (5'-3')	サイズ範囲 (bp)	Tm (°C)	増幅*
BL01	F-GCGTCGAGAAACTATCTAGGAGAG	111-117	52	+
	R-CGAAGATTCCAAAACCTGCG			
BL08	F-ATGTTGCAGCACCTTCGTGG	142-148	53	+
	R-AATTAAAGGCGTGCCTCGC			
BM5	F-TGCACCAGCAGTGCACGTTA	268-274	60*	+
	R-ACAGCTGTTGGTATCGAGCAAAGG			
BM7	F-TGGGAATGTGCAATGGAGGACTGT	159-165	60*	+
	R-ACGCTCGCGAGACTTCGACA			
BM12	F-CGAGGCGTTTCAGCCTGGGG	233-239	60*	+
	R-TTGCGAAACTCCGGCACCGA			
BA3	F-AGGCAACGTCGGAAGGGGGT	221-225	48	+
	R-GTACACGCAGCCTGCAGACGA			
BA9	F-AGCAGCGCGAGAAGGGGAGA	110-126	48	-
	R-GCCACCCTCCTGTAAGCCGGA			
BA12	F-ACGCGCTCTTATTTCCGCGA	158-168	60	+
	R-AACGACCACTACCAGCGGGC			
B10	GTGTAACCTTCTCTCGACAG	188-217	52	+
	GGGAGATGGATATAGATGAG			
B11	GCAACGAAACTCGAAATCG	143-168	52	+
	GTTTCATCCAAGTTTCATCCG			
B126	GCTTGCTGGTGAATTGTGC	150-184	57	+
	CGATTCTCTCGTGTACTCC			
B131	GATCGCCTATCTCTTCTCGG	117-131	54	+
	GAGGCGCTGTGAGCTC			
B100	CGTCCTCGTATCGGGCTAAC	146-178	58	+
	CGTGGAACGTCGTGACG			
B96	GGGAGAGAAAGACCAAG	230-248	52	+
	GATCGTAATGACTCGATATG			
B119	GATCGTGCTAGAAAAGGAAG	158-182	52	+
	CCACAGTGCAAAGTTTCTG			
B121	GAACATGTGGAACGACGG	160-170	52	+
	GAACAATCGATATGTCACCG			
B132	GAAATTCGTGCGGAGGG	151-183	58	+
	CAGAGAACTACCTAGTGCTACGC			
B116	GAATCAGGAGGCGCACG	172-176	58	+
	CGCAGCCTAAGCCACG			
B118	CCTAAGTCGCTATATCTTCG	201-223	58	+
	GAAACACGTATCTACATCTACAG			
B101	CGACTGTGCGGGTCTAAG	180-220	58	+
	GATCGCTATGTCAACAGCAG			

* プラス (+) は、エゾオオマルハナバチで使用可能なプライマー、マイナス (-) は、一部の個体は PCR 増幅するが、null アレルが多いため解析は困難であったものを示している。PCR 増幅しなかったプライマーは省略した。

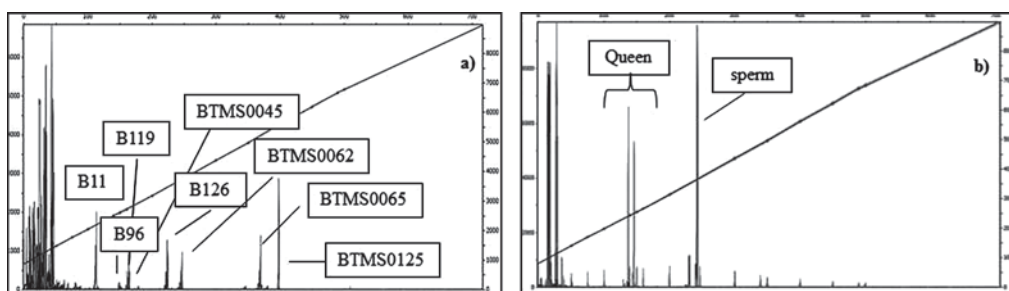


図1 マルチプレックス PCR (左) と受精嚢内 PCR (右) の結果

b) は女王蜂と精子由来 DNA の蛍光の異なるプライマーの PCR 産物を同時に泳動している。どちらも 1 色のピークしか見られない。

表2 マルチプレックス PCR 用プライマーセット

アレル座	蛍光色素
B11	VIC
B96	NED
B119	PET
B126	FAM
BTMS0045	PET
BTMS0062	FAM
BTMS0065	VIC
BTMS0125	FAM

発することができた。その1つである受精嚢内 PCR 法は、女王蜂の検体があれば交配雄蜂の遺伝子型を同定することが可能である。この手法は、育種学や生態学的調査時に女王蜂の繁殖構造（交尾回数や近交係数等）の推定に利用することができるため非常に有用性の高い方法であると思われる。一方、マルチプレックス PCR による多型解析は、1回の PCR により8個のアレル座を同時に解析することができるようになり、少量の DNA で時間と経費を節約することが可能になった。また多検体の遺伝子型解析が必要な育種学や生態学分野でのハイスループット解析にも今回開発したマイクロサテライト DNA ツールキットは、十分に貢献することができると思われる。

謝 辞

本原稿を作成するにあたり、土田浩治教授、井之口文菜および高橋萌氏にはご助言を受けた。この場を借りてお礼申し上げる。本研究は、京都産業大学先端科学技術研究所、平成24年度日本学術振興会科学研究費基盤B（課題番号24380178）、平成24年度環境省環境総合研究推進費（4Rfd-1202）による支援により行われた。

引用文献

- [1] Goulson, D. (2003) *Bumblebees, their behavior and ecology*, Oxford University Press, Oxford, New York.
- [2] Plowright, R.C. and S.C. Jay (1966) Rearing bumble bee colonies in captivity. *J. Apic. Res.* 5: 155–165.
- [3] Velthuis, H.H.W. and A. v. Doorn (2006) A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie* 37: 421–441.
- [4] 小野正人 (1996) 日本在来種マルハナバチの実用化に関する研究. *環境研究* 108: 21–25.
- [5] 鷺谷いづみ (1998) 保全生態学からみたセイヨウオオマルハナバチの侵入問題 (〈特集〉移入生物による生態系の攪乱とその対策). *日生態会誌* 48: 73–78. Inoue, M.N., S. Ishikawa.
- [6] Inoue, T. and S. Washitani (2009) Conservation ecological study of invasion of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) into a preserved area of the Notsuke Peninsula of eastern Hokkaido, Japan. *Appl Entomol Zool* 44: 337–342.
- [7] Estoup, A., A. Scholl, A. Pouvreau and M. Solignac (1995) Monoandry and polyandry in bumble bees (Hymenoptera: Bombinae) as evidenced by highly variable microsatellites. *Mol. Ecol.* 4: 89–93.
- [8] Funk, C.R., R. Schmid-Hempel and P. Schmid-Hempel (2006) Microsatellite loci for *Bombus* spp. *Molecular Ecology Notes*. 6: 83–86.

A microsatellite DNA toolkit for genotyping of bumblebee *Bombus hypocrita sapporoensis* using the multiplex PCR

Jun-ichi TAKAHASHI

Tetsuro NOMURA

Abstract

The Bumblebee is a eusocial Hymenoptera with an annual life cycle and is often utilized as an agricultural pollinator. We developed an polymorphic microsatellite DNA toolkit for the Japanese bumblebee *Bombus hypocrita sapporoensis* using multiplex PCR. At 57 of these 120 loci, high allelic variation was observed in 20 individual males. In addition to a method of spermathecae PCR, we developed 8 polymorphic microsatellite DNA toolkit for the *B. h. sapporoensis*. These results suggest that high-throughput genotyping method can be used to gain more information regarding breeding systems and for more deeply understanding social evolution in the *B. h. sapporoensis*.

Keywords: *Bombus hypocrita*, multiplex PCR, spermathecae PCR, microsatellite DNA, bumblebee