

УДК 594/577

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАНСКРИБИРУЕМЫХ СПЕЙСЕРОВ ITS1 И ITS2 ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЗЗУБОК РОДОВ *ANODONTA* И *PSEUDANODONTA* (BIVALVIA: UNIONIDAE: ANODONTINAE)

© 2019 г. А. А. Томилова^{1, *}, А. В. Кондаков^{1, 2}, О. Я. Кисиль²

¹Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. акад. Н.П. Лаверова РАН
наб. Северной Двины, 23, Архангельск, 163000 Россия

²Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова
наб. Северной Двины, 17, Архангельск, 163002 Россия

*E-mail: tomilova_alyona@mail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2018 г.

После доработки 14.01.2019 г.

Принята к публикации 24.06.2019 г.

В настоящий момент существуют трудности в идентификации пресноводных моллюсков родов *Anodonta* и *Pseudanodonta* при использовании морфологических методов. В публикации рассмотрена возможность применения для этих целей транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 в качестве молекулярно-генетических маркеров. Было подтверждено, что данный молекулярный подход совместно с морфологическими признаками позволяет установить видовую принадлежность представителей родов *Anodonta* и *Pseudanodonta*.

DOI: 10.1134/S0044459619050075

Моллюски родов *Anodonta* (Lamarck, 1799) и *Pseudanodonta* (Bourguignat, 1877) относятся к классу пресноводных двустворчатых, или пластинчатожаберных, подсем. Anodontinae (беззубки) из сем. Unionidae. Представители этих родов повсеместно распространены и могут быть найдены как в водотоках, так и стоячих водах. Они выполняют одну из основных ролей в пресноводных экосистемах и являются важным звеном комплекса организмов, участвующем в самоочищении водных объектов (Шаплыгина и др., 2016).

Для идентификации двустворчатых моллюсков используют преимущественно морфологический метод, основанный на оценке общей формы раковины, ее выпуклости, положения наиболее выступающей точки боковой поверхности створки, в некоторых случаях анализируют мягкое тело (Богатов и др., 2005). Для моллюсков родов *Anodonta* и *Pseudanodonta* характерна значительная морфологическая изменчивость (Klishko et al., 2018), поэтому ошибки в идентификации представителей этих родов всегда были проблемой для исследователей. В таких случаях в дополнение к общепринятым компараторным методам целесообразно применять молекулярно-генетические подходы. При исследовании большинства биологических объектов необходимым этапом является определение систематического положения особей, так как неправильное определение видовой при-

надлежности может повлечь за собой ошибочные выводы (Ворошилова, 2016).

В настоящее время существует широкий спектр разнообразных молекулярных маркеров, которые применяются для исследования полиморфизма нуклеотидных последовательностей. Для митохондриальной ДНК (мтДНК) эукариот характерна высокая скорость накопления генетических замен как у близкородственных видов, так и в пределах одного вида (Ballard, Whitlock, 2004). На сегодняшний день нуклеотидные последовательности участка первой субъединицы цитохром с-оксидазы (COI) применяются в ДНК-баркодинге для идентификации животных чаще, чем любой другой митохондриальный ген (Hebert et al., 2003).

Митохондриальная ДНК эволюционирует (накапливает генетические замены) быстрее, чем ядерная. При этом в ядерной ДНК стоит обратить внимание на межгенные спейсеры ITS (Internal Transcribed Spacers), которые являются некодирующими последовательностями и эволюционируют существенно быстрее по сравнению с участками рибосомального кластера (Baldwin et al., 1995; Alvarez, Wendel, 2003). Различия длин внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 связаны с присутствием в них нуклеотидных вставок и делеций, что является удобным для исследований дивергенции близкородственных организмов (Vargues, Mas-Coma, 2005).

Ранее на основе участков ITS1 и ITS2 были созданы молекулярные определительные ключи для пресноводных моллюсков Северо-Западной Европы (Källersjö et al., 2005). Кроме того, была выполнена молекулярная идентификация видов сем. Unionidae при помощи анализа длин последовательностей ITS1 после обработки специально подобранными рестриктазами (Gerke, Tiedemann, 2001; Zieritz et al., 2012).

Актуальность данной работы связана с тем, что идентификация моллюсков родов *Anodonta* и *Pseudanodonta* с помощью сравнения длин молекулярных маркеров ITS1 и ITS2 существенно облегчит и ускорит этот процесс, и исключит необходимость дорогостоящих операций по определению нуклеотидных последовательностей (секвенирование).

Задачами данной работы были оценка пригодности использования длин нуклеотидных последовательностей транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 для идентификации двустворчатых моллюсков родов *Anodonta* и *Pseudanodonta* и сравнение длин участков ITS1 и ITS2 для некоторых видов родов *Anodonta*, *Pseudanodonta*, *Unio* и *Sinanodonta*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы сборы моллюсков отряда Unionoida, выполненные в период с 2013 по 2016 год в водоемах различных бассейнов рек России (табл. 1, рис. 1). В качестве объекта исследования выступали двухстворчатые моллюски *Anodonta anatina* (L., 1758), *A. cygnea* (L., 1758), *Pseudanodonta cf. complanata* (Rossmässler, 1835) из трибы Anodontini (Lopes-Lima et al., 2017). Для сравнения были использованы виды *A. beringiana* (Middendorf, 1851), *Sinanodonta aff. woodiana* (Lea, 1834), *S. ovata* (Bogatov et Starobogatov, 1996) из того же подсем. Anodontinae, но из другой трибы Cristarini (Lopes-Lima et al., 2017). Кроме того, для сравнения использованы представители соседнего подсем. Unionidae: *Unio tumidus* (Retzius, 1788) и *U. pictorum* (L., 1758). Ткани исследуемых образцов зафиксированы в 96%-ном этиловом спирте и хранятся в коллекции “Российского музея центров биоразнообразия” на базе ФИЦКИА РАН. Выборка представителей *A. anatina* более многочисленная, включает 26 особей; также исследованы шесть особей *A. cygnea*. Вид *P. cf. complanata* — редкий и охраняемый, поэтому в данном исследовании представлен только двумя особями. В качестве дополнения данных по длине транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 включены данные из базы NCBI GenBank¹.

Выделение тотальной клеточной ДНК из тканей пресноводных моллюсков осуществлено с приме-

нением фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Амплификация последовательностей проведена при помощи праймеров ITS1F и ITS1R (White et al., 1996) для ITS1, LT1F (Bargues et al., 2001) и ITS4R (White et al., 1996) для ITS2, LCO1490 и HCO2198 (Folmer et al., 1994) для COI. ПЦР-смесь содержала около 200 нг ДНК, 10 пмоль каждого из праймеров, 2,5 мкл Таq-буфера (с 10×2 ммоль $MgCl_2$), 200 мкмоль каждого из dNTP, 0,8 единиц Таq ДНК-полимеразы (НПО “Сиб-Энзим”, Россия). Реакционная смесь была доведена деионизированной водой до объема 25 мкл. Амплификация участков включала в себя этап первоначальной денатурации ДНК — $95^\circ C$, 5 мин; затем 31–37 циклов синтеза фрагмента ДНК: $95^\circ C$ — 45 с, $57^\circ C$ (для ITS1) и $50^\circ C$ (для ITS2 и COI) — 40 с, $72^\circ C$ — 50 с; а также этап окончательной элонгации цепи — $72^\circ C$, 5 мин.

Определение генетических последовательностей фрагмента гена COI у всех исследуемых образцов двустворчатых моллюсков осуществлено при помощи автоматического секвенатора (ABI PRISM® 3730, Applied Biosystems) с использованием набора реагентов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1. (ЦКП “Геном”, ИМБ РАН). Полученные последовательности гена COI были проанализированы в программе BLAST NCBI для определения видовой принадлежности образцов моллюсков.

Рибосомальный кластер эукариот имеет в своем составе два внутренних транскрибируемых спейсера — ITS1 и ITS2, которые разделяют в рибосомной ДНК гены 18S, 5.8S и 28S рНК (White et al., 1996; Källersjö et al., 2005). Данные последовательности представляют собой объединение ядерных генов, которые располагаются в виде тандемных повторов (рис. 2).

Поскольку подобранные праймеры отжигаются на последовательностях рибосомальных генов (ITS1F на 18S рНК, ITS1R на 5.8S рНК, а LT1F на 5.8S рНК, ITS4R на 28S рНК), то амплифицированные последовательности ITS1 и ITS2 содержат участки рибосомальных генов.

Определение длин нуклеотидных последовательностей ITS1 и ITS2 осуществлено с помощью системы автоматического капиллярного электрофореза Experion™ (Bio-Rad, США) с использованием чипа 1K Analysis Kit согласно прилагаемым инструкциям. В него вносили по 11 образцов совместно с маркерной линейкой, имеющей диапазон 15–1500 п.н.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы найти истинный размер амплифицированных участков ITS1 и ITS2 для каждого отдельного вида, был определен размер рибосомальных генов 18S, 5.8S и 28S рДНК путем сравнения с нуклеотидными последовательностями

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Таблица 1. Список секвенированных и проанализированных последовательностей COI двустворчатых моллюсков

Вид	Бассейн реки	Номер образца по каталогу	Номер в GenBank
<i>Anodonta anatina</i>	Инди́га	biv 156/1	KY328448
		biv 156/2	KY328449
	Волга	biv 157/1	KY328453
	Верхняя Ангара	biv 158/1	KY328455
	Юг	biv 162	KY328458
	Онега	biv 164/1	KY328459
	Северная Двина	biv 168/2	KY328461
	Таз	biv 173/1	KY328466
	Волга	biv 174/1	KY328469
	Кереть	biv 189/1	KY328471
	Селенга	biv 190/2	KY328474
	Кубань	biv 192	KY328479
	Москва	biv 194/4	KY328480
		biv 194/5	KY328481
	Обь	biv 198/1	KY328483
		biv 198/2	KY328484
	Лена	biv 199/1	KY328488
		biv 199/2	KY328489
	Печора	biv 206/1	KY328493
	Дон	biv 208/3	KY328496
	Ока	biv 209	KY328497
	Печора	biv 210/1	KY328498
		biv 210/3	KY328499
Северная Двина	IEPN 669/2	KY328502	
Кулой	IEPN 670/1	KY328505	
Северная Двина	1НН	KY328509	
<i>Anodonta cygnea</i>	Москва	biv 194/1	MK034153
		biv 194/2	MK034154
		biv 204/1	MK034157
		biv 204/3	MK034158
	Преголя	biv 207/1	MK034159
		biv 207/3	MK034160
<i>Pseudanodonta cf. complanata</i>	Хопер	biv 195/1	MK034155
		biv 195/2	MK034156
<i>Anodonta beringiana</i>	Авача	biv 169	MK034152
<i>Sinanodonta aff. woodiana</i>	Енисей	biv 191/2	KY978735
		biv 191/5	KY978738
<i>Sinanodonta ovata</i>		biv 191/1	KY561633
<i>Unio tumidus</i>	Северная Двина	IEPN 669/6	MK034161
<i>Unio pictorum</i>		3НН	MK034162

JX081669, GU471863, KJ740491 из базы GenBank. Из полученных последовательностей ITS1 и ITS2 вычли длину рибосомальных генов, которые были амплифицированы совместно с внутренними

транскрибируемыми спейсерами. Длина данных участков составила: для ITS1 – 40 п.н. при отжиге праймера ITS1F на 18S рРНК и 52 п.н. при отжиге праймера ITS1R на 5.8S рРНК; для ITS2 – 18 п.н.



Рис. 1. Карта с точками сбора двусторчатых моллюсков.

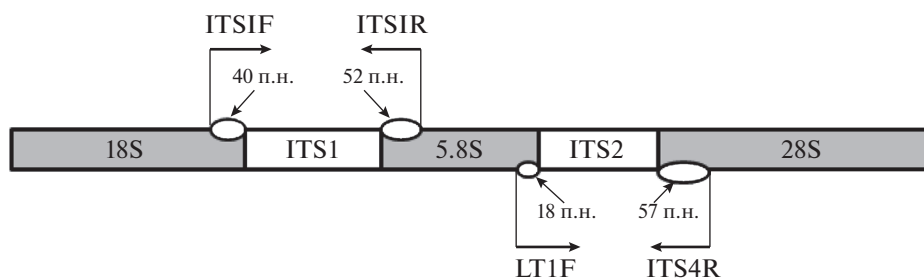


Рис. 2. Локализация праймеров на рибосомальном кластере и размер рибосомальных генов, амплифицированных совместно с ITS1 и ITS2.

при отжиге праймера LT1F на 5.8S рРНК и 57 п.н. при отжиге праймера ITS4R на 28S рРНК (рис. 2).

Из анализа амплифицированных спейсеров ITS1 и ITS2 следует, что эти последовательности варьируют по длине (табл. 2). Можно заметить, что диапазоны длин последовательностей ITS2 *P. cf. complanata* (от 310 до 321 п.н.), *A. cygnea* (от 315 до 329 п.н.), *A. anatina* (от 321 до 343 п.н.) имеют перекрывающиеся области, однако длина ITS1 значительно отличается: *P. cf. complanata* (от 462 до 464 п.н.), *A. cygnea* (от 448 до 449 п.н., от 470 до 472 п.н.), *A. anatina* (от 495 до 527 п.н.) – что позволяет отличить данные виды. По длине ITS1 для

пресноводных моллюсков видов *U. tumidus* (315 п.н.) и *U. pictorum* (333 п.н.) можно предположить, что особи первого вида относятся либо к *P. cf. complanata* (от 310 до 321 п.н.), либо к *A. cygnea* (от 310 до 329 п.н.), а второго вида – к *A. anatina* (от 321 до 343 п.н.), однако данное предположение опровергает интервал последовательностей ITS2. А длина транскрибируемого спейсера ITS2 представителей вида *S. ovata* (273 п.н.) входит в диапазон аналогичного участка для *S. aff. woodiana* (от 273 до 282 п.н.), но отличается по участку ITS1: *S. ovata* (496 п.н.), *S. aff. woodiana* (502 п.н.).

Таблица 2. Каталогные номера образцов двустворчатых моллюсков и длина амплифицированных последовательностей ITS1 и ITS2

Вид	Номер образца по каталогу	ITS1 (п.н.)		ITS2 (п.н.)	
		длина	диапазон	длина	диапазон
<i>Anodonta anatina</i>	biv 156/1	497	495–527	338	321–343
	biv 156/2	495		338	
	biv 157/1	499		342	
	biv 158/1	502		321	
	biv 162	504		338	
	biv 164/1	504		335	
	biv 168/2	504		335	
	biv 173/1	509		333	
	biv 174/1	508		334	
	biv 189/1	524		333	
	biv 190/2	527		334	
	biv 192/1	514		339	
	biv 194/4	518		336	
	biv 194/5	521		343	
	biv 198/1	509		338	
	biv 198/2	504		338	
	biv 199/1	506		336	
	biv 199/2	512		338	
	biv 206/1	512		338	
	biv 208/3	517		343	
	biv 209	517		340	
	biv 210/1	507		340	
	biv 210/3	505		339	
	IEPN 669/2	499		337	
	IEPN 670/1	517		335	
	1НН	508		341	
<i>Anodonta cygnea</i>	biv 194/1	449	448–449	325	315–329
	biv 194/2	448	470–472	320	
	biv 204/1	472		327	
	biv 204/3	470		329	
	biv 207/1	471		325	
	biv 207/3	470		315	
<i>Pseudanodonta cf. complanata</i>	biv 195/1	462	462–464	321	310–321
	biv 195/2	464		310	
<i>Anodonta beringiana</i>	biv 169	479	479	266	266
<i>Sinanodonta aff. woodiana</i>	biv 191/2	502	502	273	273–282
	biv 191/5	502		282	
<i>Sinanodonta ovata</i>	biv 191/1	496	496	273	273
<i>Unio tumidus</i>	IEPN 669/6	448	448	315	315
<i>Unio pictorum</i>	3НН	416	416	333	333

Таблица 3. Данные для длин амплифицированных последовательностей ITS1 и ITS2 согласно современным данным JX081669, GU471863, KJ740491 из GenBank

Вид	Номер в GenBank	ITS1 (п.н.)		ITS2 (п.н.)	
		длина	диапазон	длина	диапазон
<i>Anodonta anatina</i>	DQ060177	511	511–513	345	345
	DQ060178	511		345	
	DQ060179	511		345	
	DQ060180	513		345	
	DQ060181	512		345	
<i>Anodonta cygnea</i>	DQ060185	486	480–486	335	335–339
	DQ060186	480		339	
<i>Pseudanodonta complanata</i>	DQ060182	494	494–495	335	335
	DQ060183	495		335	
	DQ060184	494		335	
<i>Unio tumidus</i>	DQ060191	450	450	341	341
	DQ060192	450		341	
<i>Unio pictorum</i>	DQ060189	434	434	335	335
	DQ060190	434		335	
<i>Unio crassus</i>	DQ060187	423	423–424	323	323–324
	DQ060188	424		324	

Таблица 4. Сводные данные для длин амплифицированных последовательностей ITS1 и ITS2

Вид	ITS1 (п.н.)		ITS2 (п.н.)	
<i>Anodonta anatina</i>	495–527	495–527	321–343	321–345
	511–513*		345*	
<i>Anodonta cygnea</i>	448–449	448–449	315–329	315–339
	470–472	470–486		
	480–486*		335–339*	
<i>Anodonta beringiana</i>	479	479	266	266
<i>Pseudanodonta complanata</i>	494–495*	494–495*	335*	335*
<i>Pseudanodonta cf. complanata</i>	462–464	462–464	310–321	310–321
<i>Sinanodonta aff. woodiana</i>	502	502	273–282	273–282
<i>Sinanodonta ovata</i>	496	496	273	273

Примечание. * по: Källersjö et al., 2005.

Если принимать во внимание перекрытие длин последовательностей ITS1, то можно предположить, что особи вида *S. ovata* (496 п.н.) и *S. aff. woodiana* (502 п.н.) могут относиться к виду *A. anatina* (от 495 до 527 п.н.), однако это утверждение не верно, поскольку длины последовательностей ITS2 варьируют у пресноводных моллюсков вида *A. anatina* в других пределах (от 321 до 343 п.н.), что не характерно для особей вида *S. ovata* (273 п.н.) и *S. aff. woodiana* (от 273 до 282 п.н.).

Наши данные по длинам последовательностей спейсеров ITS1 и ITS2 позволяют расширить интервалы значений, установленные в предыдущем исследовании этих видов (Källersjö et al., 2005). В ходе исследования нами было выявлено и учтено, что полученные ранее последовательности спейсеров (Källersjö et al., 2005) были выравнены некорректно и, следовательно, имеют другую длину. Согласно современным данным, путем сравне-

ния с последовательностями JX081669, GU471863, KJ740491 из базы GenBank нами были рассчитаны интервалы транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 для идентификации двустворчатых моллюсков (табл. 3). Полученные данные были объединены с результатами предыдущих исследований (Källersjö et al., 2005) и представлены в сводной табл. 4 и на рис. 3. При анализе последовательностей спейсера ITS2 для моллюсков родов *Anodonta* и *Sinanodonta* видно, что длины амплифицированных последовательностей существенно отличаются, что позволяет их идентифицировать (рис. 3). Моллюски вида *P. cf. complanata* достоверно отличаются от особей других видов длиной спейсера ITS1, а интервалы, полученные для моллюсков *P. complanata*, пересекаются с таковыми у *A. anatina* (по ITS1 и ITS2), что свидетельствует о том, что использование спейсеров не во всех случаях позволяет корректно определить видовую принадлежность этих мол-

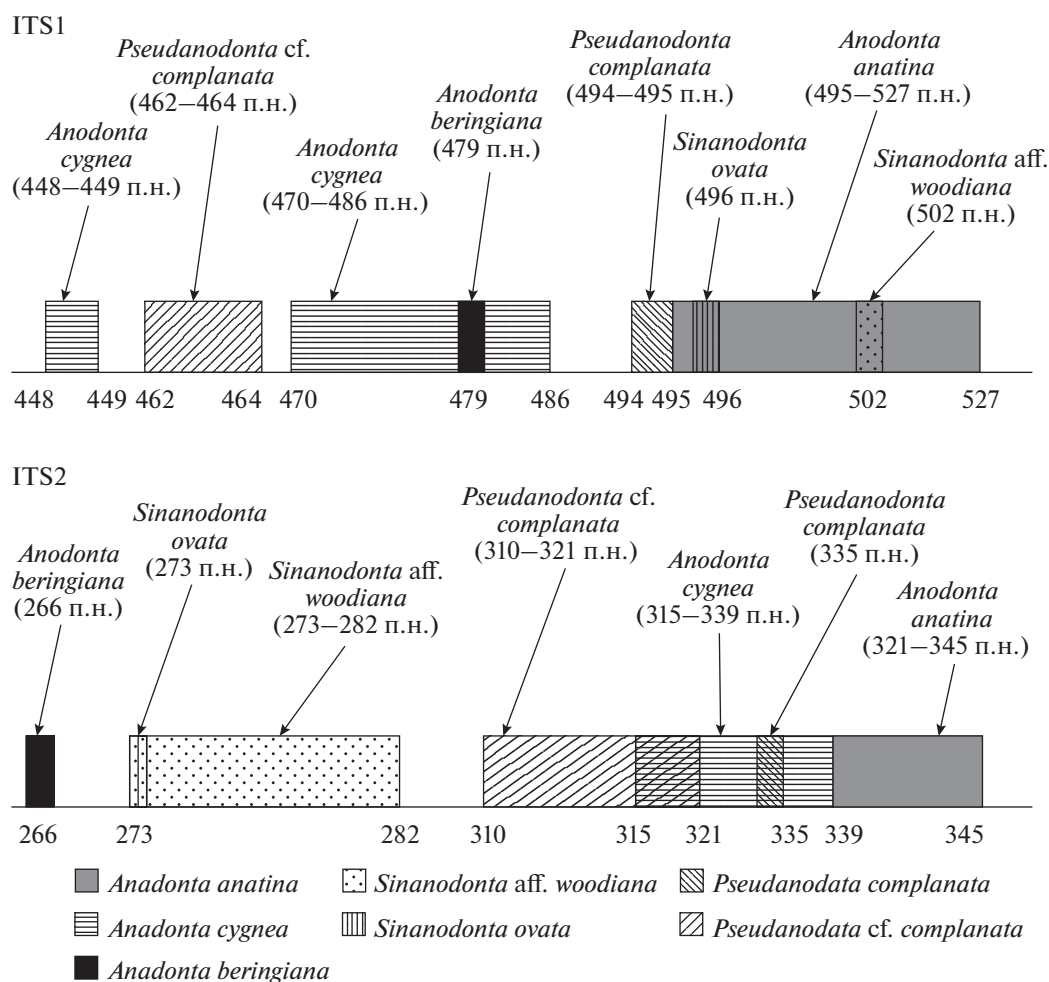


Рис. 3. Схема длин транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 для представителей родов *Anodonta*, *Pseudanodonta* и *Sinanodonta*.

люсков. В таких ситуациях для точной идентификации вида необходимо осуществлять ДНК-баркодинг или рестрикционный анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции *HinfI* (Zieritz et al., 2012).

Полученные данные по транскрибируемым спейсерам ITS1 и ITS2 показывают, что у пресноводных моллюсков родов *Anodonta* и *Pseudanodonta* в разных частях ареала наблюдается не только морфологическая изменчивость, но и генетический полиморфизм.

Для подтверждения достоверности предлагаемого метода идентификации у всех исследуемых образцов двустворчатых моллюсков предварительно были определены генетические последовательности фрагмента гена COI. Различия полученных последовательностей, в сравнении с представленными в базе GenBank, не превысили 0.5% для всех исследуемых образцов моллюсков, кроме особей *P. cf. complanata*. Исследуемые образцы моллюсков *P. cf. complanata*, собранные в р. Хопер (бассейн р. Дон), отличаются от последовательностей

гена COI *P. complanata*, задепонированных в базе данных GenBank, на 2%. Это свидетельствует о том, что данный вид является сестринским видом по отношению к *P. complanata*. Данные по депонированию последовательностей гена COI в базе GenBank представлены в табл. 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что совместное определение длин транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 может служить качественным маркером для определения видового статуса представителей родов *Anodonta* и *Pseudanodonta*, за исключением случаев идентификации видов *P. complanata* и *A. anatina*, которые легко могут быть идентифицированы морфологически или с применением рестрикционного анализа. Следовательно, молекулярно-генетические методы способны эффективно дополнить классические подходы в определении двустворчатых моллюсков.

Авторы благодарны И.Н. Болотову, И.В. Вихреву, М.В. Винарскому, М.Ю. Гофарову, А.А. Махрову, С.Е. Соколовой, О.В. Аксёновой, В.С. Артамоновой и другим коллегам, которые в разные годы участвовали в проведении полевых работ и сборе моллюсков.

Полевые работы по сбору материала и молекулярно-генетические исследования выполнены при поддержке государственного задания № 0409-2019-0041 и гранта РФФИ № 17-45-290066_р_а. Камеральная обработка собранных материалов и подготовка рукописи статьи выполнены при поддержке гранта РНФ № 18-77-00058.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богатов В.В., Старобогатов Я.И., Прозорова Л.А., 2005. Моллюски рода *Colleopterum* (Anodontinae, Bivalvia) России и сопредельных территорий // Зоол. журн. Т. 84. № 9. С. 1050–1063.
- Ворошилова И.С., 2016. Проблемы и перспективы применения молекулярно-генетических методов для таксономической ревизии пресноводных моллюсков // Тр. Ин-та биол. внутр. вод РАН. № 73. С. 12–24.
- Шаплыгина Ю.Н., Курочкина Т.Ф., Насибулина Б.М., 2016. Интегральная значимость пресноводных моллюсков в самоочищении воды дельты реки Волги // Естеств. науки. Экология. Т. 55. № 2. С. 27–32.
- Alvarez I., Wendel J.F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol. V. 29. № 3. P. 417–434.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M. et al., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // Ann. Mo. Bot. Gard. V. 82. № 2. P. 247–277.
- Ballard J.W., Whitlock M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria // Mol. Ecol. V. 13. № 4. P. 729–744.
- Bargues M.D., Mas-Coma S., 2005. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses // J. Helminthol. V. 79. № 3. P. 257–267.
- Bargues M.D., Vigo M., Horak P. et al., 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiases, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences // Infect. Genet. Evol. V. 1. № 2. P. 87–107.
- Folmer O., Black M., Hoeh W. et al., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. V. 3. № 5. P. 294–299.
- Gerke N., Tiedemann R., 2001. A PCR-based molecular identification key to the glochidia of European freshwater mussels (Unionidae) // Conserv. Genet. V. 2. № 3. P. 285–287.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L. et al., 2003. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Roy. Soc. B. Biol. Sci. V. 270. № 1512. P. 313–321.
- Källersjö M., Proschwitz T., von, Lundberg S. et al., 2005. Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies in freshwater mussels: An example using Unionidae from northwestern Europe // Zool. Scr. V. 34. № 4. P. 415–424.
- Klishko O.K., Lopes-Lima M., Bogan A.E. et al., 2018. Morphological and molecular analyses of Anodontinae species (Bivalvia, Unionidae) of Lake Baikal and Transbaikalia // PloS One. V. 13. № 4. P. e0194944.
- Lopes-Lima M., Froufe E., Do V.T. et al., 2017. Phylogeny of the most species-rich freshwater bivalve family (Bivalvia: Unionida: Unionidae): Defining modern subfamilies and tribes // Mol. Phylogenet. Evolut. V. 106. P. 174–191.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1626 p.
- White L.R., McPheron B.A., Stauffer J.R., 1996. Molecular genetic identification tools for the unionids of French Creek, Pennsylvania // Malacologia. V. 38. № 1–2. P. 181–202.
- Zieritz A., Gum B., Kuehn R. et al., 2012. Identifying freshwater mussels (Unionoida) and parasitic glochidia larvae from host fish gills: A molecular key to the North and Central European species // Ecol. Evol. V. 2. № 4. P. 740–750.

Usage of transcribed spacers ITS1 and ITS2 for identification of freshwater mussels of the genera *Anodonta* and *Pseudanodonta* (Bivalvia: Unionidae: Anodontinae)

A. A. Tomilova^{a,*}, A. V. Kondakov^{a,b}, O. Ya. Kisil^b

^aLaverov Federal Center for Integrated Arctic Research, RAS
Severnaya Dvina Emb., 23, Arkhangelsk, 163000 Russia

^bNorthern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov
Severnaya Dvina Emb., 17, Arkhangelsk, 163002 Russia

*e-mail: tomilova_alyona@mail.ru

Presently, there are difficulties in freshwater mussels' identification of the genera *Anodonta* and *Pseudanodonta* by morphological methods. Here we discuss the usage of internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 as genetic markers for these purposes. As a result, it was confirmed that this molecular approach, together with morphological characters, makes it possible to distinguish species within the genera *Anodonta* and *Pseudanodonta*.