

# 利用 ND1、ITS1 序列研究三种背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 分类学问题\*

赵颖<sup>1,2</sup> 陈修报<sup>1,2</sup> 杨健<sup>1,2</sup> 刘洪波<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心  
中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室 无锡 214081)

**摘要** 利用 ND1、ITS1 序列差异对采自太湖、在形态上被认为是背角无齿蚌、圆背角无齿蚌、椭圆背角无齿蚌的三种个体进行鉴定, 并与从 NCBI 中下载到的同属不同种褶纹冠蚌的 ND1、ITS1 序列进行对比, 分析了基于 Kimura 2-parameter 模型参数得到的遗传距离, 并构建了 NJ 树。结果表明, 本研究中所有背角无齿蚌种间遗传距离变化范围 ND1 为 0—0.0082, ITS1 为 0.002—0.087, 远小于同褶纹冠蚌的遗传距离 0.892—0.905 和 1.1295—1.1307, 支持将背角无齿蚌、圆背角无齿蚌、椭圆背角无齿蚌归为同种的观点。

**关键词** ND1, ITS1, 背角无齿蚌, 圆背角无齿蚌, 椭圆背角无齿蚌, 物种鉴定  
中图分类号 Q959.215

在以往的记述中, 有关我国蚌科分类大多以贝壳的形态(壳长、宽、高、贝壳膨胀度等)为依据; 然而贝壳的形态随环境的变化会有差异, 在许多种内变异很大或种间差异并不明显的情况下, 标本难以准确鉴定, 给研究工作带来了不便。近年来, 许多学者也试图从解剖学、生态学、生理学等不同角度来探讨淡水贝类的分类问题, 积累了许多资料(吴红松, 2006<sup>1</sup>; 闻海波等, 2007; 魏开建等, 2003; 杨品红等, 2009; 罗文等, 2010)。随着分子生物学的迅速发展, 分子手段也被应用于贝类的系统发育研究, 并取得了很好的结果(王建军等, 2008; 魏开建, 2004<sup>2</sup>)。ITS1 片段为核 DNA 中 ITS 转录间隔区的一段片段, 因为 ITS 区最终不参加核糖体的形成, 所以受到的选择压力较小, 进化速率较快, 在亲缘关系的建立和分类阶元鉴定上, ITS 区适合于相近种和同种的不同地理种

群及不同品系的研究(徐晖等, 2008; 袁媛等, 2008; 魏开建, 2004<sup>2</sup>)。ND1 是 NADH 氧化还原酶的第一个亚基, 它可以从种的水平来推断某个属的系统发育关系(毛新伟等, 2009)。

太湖是中国第三大淡水湖, 随着社会经济的发展, 环太湖周边地区的污水不断入侵, 太湖水质呈现出逐年恶化的趋势, 富营养化加剧, 蓝藻频繁暴发(Simon *et al*, 1994)。笔者实验室在利用水生生物进行环境污染监测的研究中筛选出背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)为生物指示贝类, 对太湖水域重金属、持久性有机物、藻毒素等污染进行了有效的监测(杨健等, 2005; 虞锐鹏等, 2007; Yang *et al*, 2008; Bian *et al*, 2009)。背角无齿蚌属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、真瓣鳃目(Eulamellibranchia)、蚌科(Unionidae)、无齿蚌亚科

\* 江苏省自然科学基金项目, BK2006030 号; 人力资源和社会保障部留学人才项目, 2-115084 号; 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室开放基金课题, YZ2009-02 号; 国家自然科学基金项目, 31072214 号。赵颖, E-mail: zy19831210@126.com

1) 吴红松, 2006. 基于形态学和分子生物学资料探讨蚌科无齿蚌属和帆蚌属种的分类地位. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 5—53  
2) 魏开建, 2004. 中国蚌科的遗传多样性与系统发育的研究. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 28—133

通讯作者: 杨健, 博士, 研究员, E-mail: jiany@ffrc.cn

收稿日期: 2010-09-07, 收修改稿日期: 2011-01-21

(Anodontinae)、无齿蚌属(*Anodonta*), 广布于我国的淡水环境中。根据形态上的一些差异, 有专家提出该蚌应分为三种, 即背角无齿蚌(*Anodonta woodiana woodiana*)、圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana pacifica*)、椭圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana elliptica*)的观点(刘月英等, 1976)。但是, 实践中背角无齿蚌的形态差异界限较为含糊, 物种鉴定困难。近年, 有的研究者还对该分类方法提出了疑义(吴红松, 2006<sup>1)</sup>; 魏开建等, 2003)。由此产生了在今后应用背角无齿蚌进行生物监测时是否需要分种等问题。针对这些情况, 本研究借助于上述分子生物学手段的优点, 尝试利用 ND1、ITS1 序列的差异性来对太湖水域采集到的形态上被认为分别是三种背角无齿蚌的个体中相关基因序列特征的比较研究, 一方面期望探讨这些个体中上述基因序列的差异程度, 从而从新的角度探讨背角无齿蚌的分类问题, 另一方面也为笔者研究室正在开展的渔业生态环境“淡水背角无齿蚌观察”工作提供进一步的基础理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

用于本研究的标本采集于太湖南泉实验基地、梅良湖段、马山龙头渚、新安段、拖山水域, 从采集的共 118 个样本中选取外形特征最突出的个体, 根据形态学特征(刘月英等, 1976)分别归类于背角无齿蚌、

圆背角无齿蚌、椭圆背角无齿蚌(表 1)。

### 1.2 实验条件

每个样本取闭壳肌约 40mg, 用 TAKARA 基因组试剂盒提取总 DNA, PCR 扩增采用常规方法, 反应体系为: 10×buffer 5μl, dNTP 4μl, *Taq* 酶 0.5μl, 正反引物各 1μl, 模板 1μl, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 50μl。ND1 引物为 Leu-uur (5'-TGGCAGAAAAGTGCAGATTAAGC-3'), NL-12073 (5'-TCGGAATTCTCCTTCYGCAA AGTC-3') (King *et al*, 1999)。PCR 反应以大约 100ng DNA 为反应模板。参照赵大显等(2007)反应程序, 笔者经过反复实验及改进, 最终确定反应程序为: 94℃ 预变性 2min; 94℃ 变性 30s; 57℃ 退火 30s; 72℃ 延伸 1min; 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 8min。ITS1 片段的引物分别为 ITS-5.8S (5'-AGCTTGCTGCGTTCTTCATCG-3'), ITS-18S (5'-AAAAAGCTTCCGATGGTGAACCTGCG-3') (King *et al*, 1999)。PCR 反应以大约 100ng DNA 为反应模板。参照周春花等(2007)反应程序, 笔者经过反复实验及改进, 最终确定反应程序为: 94℃ 预变性 2min; 94℃ 变性 30s; 58℃ 退火 30s; 72℃ 延伸 1min; 共 40 个循环; 最后 72℃ 延伸 8min。用得到 PCR 原液进行测序。

### 1.3 数据处理

从 NCBI 下载褶纹冠蚌 ND1、ITS1 序列进行比较, NCBI 编号分别为 DQ156176、EU580111。利用 Clustal-X 软件对基因序列进行排序并辅以手工校正。使用 MEGA4.0 软件中 Kimura 2-Parameter 模型计算

表 1 本研究中蚌样本的基本信息  
Tab.1 Basic information of the mussels in the present study

样本编号	标本号	形态学定种	ND1 序列号	ITS1 序列号	采集地点
2008AWN-1	1	圆背角无齿蚌	GQ393009	GQ392998	太湖新安水域
2008AWN-3	3	圆背角无齿蚌	GQ393010	GQ392999	太湖新安水域
2008AWML-44	44	圆背角无齿蚌	GQ393017	GQ393006	太湖梅梁湖水域
2008AWML-56	56	圆背角无齿蚌	GQ393018	GQ393007	太湖梅梁湖水域
2008AWML-66	66	圆背角无齿蚌	GQ393019	GQ393008	太湖梅梁湖水域
2008AWN-6	6	椭圆背角无齿蚌	GQ393011	GQ393000	南泉实验基地
2008AWN-7	7	椭圆背角无齿蚌	GQ393012	GQ393001	南泉实验基地
2008AWN-9	9	椭圆背角无齿蚌	GQ393013	GQ393003	南泉实验基地
2008AWN-10	10	椭圆背角无齿蚌	GQ393014	GQ393004	南泉实验基地
2008AWN-8	8	背角无齿蚌	—	GQ393002	南泉实验基地
2008AWN-11	11	背角无齿蚌	GQ393015	GQ393005	太湖马山龙头渚
2008AWN-12	12	背角无齿蚌	GQ393016	—	太湖新安水域

1) 吴红松, 2006. 基于形态学和分子生物学资料探讨蚌科无齿蚌属和帆蚌属种的分类地位. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 5—53

遗传距离, 并构建 NJ 树。

## 2 结果

### 2.1 ITS1 结果比较

将测序结果进行比较, 先用 Clustal-X 排序软件对 ITS-1 序列进行对位排列, 辅以手工校正。采用 Mega4.0 中的统计软件计算它们的长度和碱基含量。所测序列长度为: 518—535bp, 去掉首尾两端不准确碱基, 共 469bp 长度序列进行比对, 平均碱基含量为: A 25.2%, T 22.0%, C 26.5%, G 26.3%; C+G 含量大于 A+T 含量。利用 Mega4.0 软件中的 Kimura 双参数法统计序列的差异数和碱基替换情况, 见表 2。种间核苷酸变异值为 0.002—0.087, 碱基替换情况为 0.002—0.013。用 MAGE4.0 程序对三种无齿蚌进行计算, 其中有 178 个变异位点, 60 个简约信息位点。再用 Mega 4.0 软件中的 Kimura2-parameter 模型计算它们之间的遗传距离; 并采用该软件构建其 NJ 树(图 1)。结果显示褶皱冠蚌与圆背角无齿蚌、椭圆背角无齿蚌和背角无齿蚌遗传距离差异均很大, 但是背角无齿蚌、圆背角无齿蚌和椭圆背角无齿蚌之间的遗传距离却很小, ITS1 片段三种无齿蚌间的遗传距离为 0.002—0.087, 而褶皱冠蚌同三种无齿蚌间的遗传距离为 0.892—0.914。三种蚌间的遗传距离远远小于种间的遗传距离。从得到的序列分析结果看, ITS1 序列的判别灵敏性高于 ND1 序列的判别度, 表明 ITS1 序列更加适合近缘物种间的比较判别。

### 2.2 ND1 结果比较

得到测序结果进行比较, 先用 Clustal-X 排序软

件对 ND1 序列进行对位排列, 辅以手工校正。采用 Mega4.0 中的统计软件计算它们的长度和碱基含量。所测序列长度为: 629—655bp, 去掉首尾不准确的碱基, 594bp 用于序列比对, 平均碱基含量为: A 34.3%, T 30.7%, C 12.9%, G 22.1%。A+T 的含量高于 G+C 的含量。利用 Mega4.0 软件中的 Kimura 双参数法统计序列的差异数和碱基替换情况, 见表 3。种间核苷酸变异值是 0—0.0082。碱基替换情况是 0—0.0037。用 MAGE4.0 程序对三种无齿蚌基因序列对位排列后的片段计算, 其中有 282 个变异位点, 5 个简约信息位点。再用 Mega 4.0 选用 Kimura 2-parameter 模型软件计算它们之间的遗传距离; 并采用该软件构建其 NJ 树(图 2)。结果显示褶皱冠蚌与圆背角无齿蚌、椭圆背角无齿蚌和背角无齿蚌遗传距离差异均很大为 1.1295—1.1307, 但是背角无齿蚌、圆背角无齿蚌和椭圆背角无齿蚌之间的遗传距离却是很小, ND1 片段的遗传距离为 0—0.0082。

## 3 讨论

核酸的变异表现了物种间的差异, 刘月英等(1976)根据 3 种无齿蚌的外部形态将背角无齿蚌、圆背角无齿蚌、椭圆背角无齿蚌定为 3 个种, 拉丁名采用了“三名法”。三名法是用来命名亚种的, 亚种以地理性隔离来定义。由于本研究中的实验样本均采自太湖, 应该不存在地理上的隔离。ITS1 片段为核 DNA 中 ITS 转录间隔区的一段片段, 因为 ITS 区最终不参加核糖体的形成, 所以受到的选择压力较小, 进化速率较快, 在亲缘关系的建立和分类阶元鉴定上, ITS

表 2 ITS1 片段遗传距离  
Tab.2 Genetic distances calculated from ITS1 gene sequences

标本号	1	3	6	7	9	10	11	12	44	56	66
1											
3	0.045										
6	0.059	0.041									
7	0.039	0.011	0.034								
9	0.077	0.080	0.087	0.073							
10	0.032	0.032	0.037	0.021	0.080						
11	0.045	0.017	0.037	0.006	0.080	0.023					
12	0.043	0.015	0.034	0.004	0.077	0.026	0.006				
44	0.041	0.013	0.037	0.002	0.075	0.023	0.004	0.006			
56	0.041	0.013	0.037	0.002	0.075	0.023	0.008	0.006	0.004		
66	0.043	0.015	0.039	0.004	0.077	0.023	0.006	0.008	0.002	0.006	
褶皱冠蚌	0.902	0.902	0.904	0.897	0.914	0.895	0.899	0.892	0.904	0.905	0.902

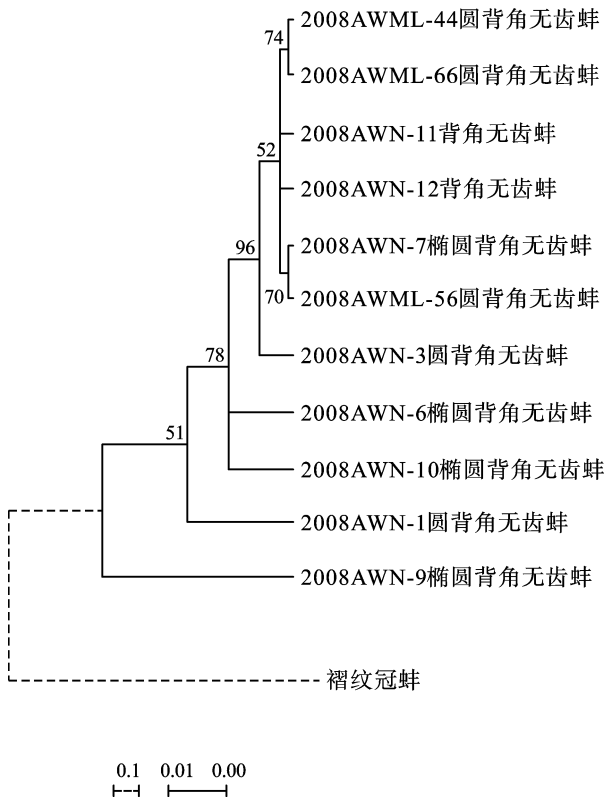


图1 ITS1片段构建的NJ树

Fig.1 NJ tree based on ITS1 sequences

区适合于相近种和同种的不同地理种群及不同品系的研究(魏开建, 2004<sup>1)</sup>)。ND1 是 NADH 氧化还原酶的第一个亚基, 它可以从种的水平来推断某个属的

系统发育关系(毛新伟等, 2009)。前人的研究报道中, ITS1 和 ND1 两种基因片段已经在锯眼蝶亚科、扭蚌、反扭蚌等物种中对种进行的判别和鉴定非常成功(赵大显等, 2007; 周春花等, 2007; 吴冰等, 2002; 殷先兵等, 2007)。以此为依据, 本研究认为这两种片段同样适用于三种无齿蚌的分类鉴定工作, 利用这 2 种基因片段对从外形上被认为是 3 种的背角无齿蚌进行了分析, 其中引用同为无齿蚌属的褶纹冠蚌作为外来种与背角无齿蚌、圆背角无齿蚌、椭圆背角无齿蚌进行比较。比较结果显示三种无齿蚌之间遗传距离很小, 但是三种无齿蚌与同属的褶纹冠蚌之间相比, 遗传差异显著, 并且所构建的 NJ 树中显示三种蚌之间差异虽然很小, 但是并没有按照形态学所定种类别聚类, 而是分散的分布, 说明三种无齿蚌之间并没有分归为 3 类的趋向, 它们之间的遗传差异很可能只是种内的个体差异造成, 并不存在种间差异。从得到的序列分析结果看, ITS1 序列的判别在个体间的灵敏性高于 ND1 序列的判别度, ND1 序列的判别结果两个种群间的差异度要大于 ITS1 序列的判别结果, 两种片段分析得到的结论结果相同, 表明两种序列均适合在本实验中对三种无齿蚌种间或是种内进行判别。

吴红松(2006)<sup>2)</sup>利用 16SrRNA 和 ITS1 两个基因片段对背角无齿蚌和椭圆背角无齿蚌的分析结论中认为两种无齿蚌差异水平为种内差异, 本研究与其

表3 ND1片段遗传距离

Tab.3 Genetic distances calculated from ND1 gene sequences

标本号	1	3	6	7	8	9	10	11	44	56	66
1											
3	0.0066										
6	0.0066	0.0000									
7	0.0066	0.0000	0.0000								
8	0.0016	0.0082	0.0082	0.0082							
9	0.0000	0.0066	0.0066	0.0066	0.0016						
10	0.0000	0.0033	0.0066	0.0066	0.0016	0.0000					
11	0.0033	0.0066	0.0066	0.0066	0.0016	0.0033	0.0033				
44	0.0016	0.0082	0.0082	0.0082	0.0033	0.0016	0.0016	0.0049			
56	0.0016	0.0082	0.0082	0.0082	0.0000	0.0016	0.0016	0.0016	0.0033		
66	0.0016	0.0082	0.0082	0.0082	0.0000	0.0016	0.0016	0.0016	0.0033	0.0000	
褶纹冠蚌	1.1295	1.1307	1.1307	1.1307	1.1295	1.1295	1.1295	1.1295	1.1295	1.1295	1.1295

1) 魏开建, 2004. 中国蚌科的遗传多样性与系统发育的研究. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 28—133

2) 吴红松, 2006. 基于形态学和分子生物学资料探讨蚌科无齿蚌属和帆蚌属种的分类地位. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 5—53

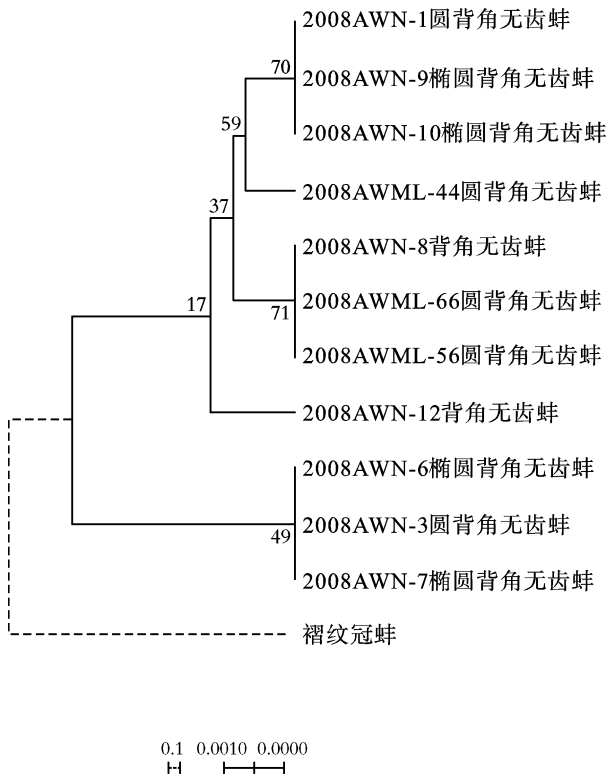


图 2 ND1 片段构建的 NJ 树

Fig.2 NJ tree based on partial ND1 sequences

所得结论相似;魏开建(2004)<sup>1)</sup>利用 RAPD 和 ITS1 两种方法对圆背角无齿蚌和背角无齿蚌进行比较分析,得到结果为利用 RAPD 方法认为圆背角无齿蚌应恢复其种的分类地位,但是利用 ITS1 方法进行分析比较则不能将二者分为两个种。与前人实验对比,本实验利用生活在同一水域范围的三种无齿蚌,第一次将这三种无齿蚌同时进行比较研究,将不同水域环境对三种蚌造成的差异尽可能的减小以缩小环境因素所带来的误差;在分子生物学的比较中,运用两种被广泛应用和认可的种间判别的片段,以保证方法的有效性和可靠性。

综上所述,本研究的结果支持背角无齿蚌、圆背角无齿蚌、椭圆背角无齿蚌归为同一物种的观点。今后为进一步完善上述观点,还需要在背角无齿蚌形态学,幼体、幼虫的发育特征、生理结构比较等方面进行更加深入、系统的研究。

致谢 本研究得到了中国科学院动物研究所刘月英研究员,南昌大学吴小平教授、欧阳珊教授,中国

水产科学研究院淡水渔业研究中心俞菊华研究员、曹哲明博士、闻海波老师的协助,谨致谢忱。

## 参 考 文 献

- 王建军,李家乐,汪桂玲等,2008. 我国五大湖三角帆蚌群体 ITS-1 序列变异分析. 湖泊科学, 20(2): 208—214
- 毛新伟,徐枫,徐彬等,2009. 太湖水质及富营养化变化趋势分析. 水资源保护, 25(1): 48—51
- 刘月英,王跃先,张文珍,1976. 中国经济动物志——淡水软体动物. 北京: 科学出版社, 106—108
- 杨健,王慧,朱宏宇等,2005. 背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)在五里湖中的重金属富集. 长江流域资源与环境, 14(3): 362—366
- 杨品红,王志陶,2009. 人工育珠对三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)遗传基因影响的初步研究. 海洋与湖沼, 40(5): 633—639
- 吴冰,蔡俊鹏,Collin M D,2002. 基于 ITS1 DNA 序列分析的几种酵母菌的分子分类. 微生物学通报, 9(4): 41—45
- 罗文,杨受保,丁盈等,2010. 三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)珍珠形成初期钙代谢的特征分析. 海洋与湖沼, 41(6): 895—900
- 周春花,欧阳珊,吴小平等,2007. 基于 16S rRNA 和 ND1 基因序列的中国蚌科丽蚌属的系统发育. 动物学报, 53(6): 1024—1030
- 赵大显,吴红松,吴小平等,2007. 基于 rRNA 基因 ITS-1 序列探讨扭蚌和反扭蚌的分类地位. 水产科学, 26(6): 349—351
- 闻海波,顾若波,徐钢春等,2007. 美国紫踵劈蚌与三角帆蚌和褶纹冠蚌的形态比较与判别分析. 动物学杂志, 42(3): 84—89
- 袁媛,高玮玮,吴琪等,2008. 黄、渤海地区青蛤(*Cyclina sinensis*)种群的 ITS 序列遗传变异与遗传结构分析. 海洋与湖沼, 39(6): 665—670
- 徐晖,李军,孔晓瑜等,2008. 6 种舌鳎亚科鱼类 ITS1 序列长度多态性及系统分析. 海洋与湖沼, 39(1): 35—41
- 殷先兵,郝家胜,许丽等,2007. 基于线粒体 ND1 和 CO1 基因序列探讨锯眼蝶亚科主要类群的系统发生关系. 动物学研究, 28(5): 477—484
- 虞锐鹏,陶冠军,贡小清等,2007. 高效液相色谱-质谱联用法测定背角无齿蚌体内微囊藻毒素. 分析测试学报, 26(5): 671—674
- 魏开建,熊邦喜,赵小红等,2003. 五种蚌的形态变异与判别分析. 水产学报, 27(1): 13—18
- Bian X, Liu H, Gan J *et al*, 2009. HCH and DDT residues in bivalves *Anodonta woodiana* from the Taihu Lake, China. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 56(1): 67—76
- King T L, Eackles M S, Gjetvaj B *et al*, 1999. Intraspecific phy-

1) 魏开建,2004. 中国蚌科的遗传多样性与系统发育的研究. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 28—133

- logeography of *Lasmigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. *Molecular Ecology*, 8: 65—78
- Simon C, Frati F, Beckenbach A *et al*, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651—701
- Yang J, Harino H, Liu H *et al*, 2008. Monitoring the organotin contamination in the Taihu Lake of China by bivalve mussel *Anodonta woodiana*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(2): 164—168

## THE SPECIES IDENTIFICATION OF THREE *ANODONTA WOODIANA* SPECIES BASED ON SEQUENCE DIFFERENCES OF ND1 AND ITS1 GENES

ZHAO Ying<sup>1,2</sup>, CHEN Xiu-Bao<sup>1,2</sup>, YANG Jian<sup>1,2</sup>, LIU Hong-Bo<sup>2</sup>

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agriculture University, Wuxi, 214081; 2. Key Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, 214081)

**Abstract** *Anodonta woodiana* (Mollusca, Lamellibranchia, Eulamellibranchia, Unionidae, Anodontinae, *Anodonta*) is currently used as a sentinel species to monitor environmental contamination for the Freshwater Mussel Watch program (FMWp) in our laboratory. This unionid mussel is broadly distributed in freshwater environment of China and is traditionally divided into 3 species, *A. woodiana elliptica*, *A. woodiana pacifica*, and *A. woodiana woodiana*, based on the differences in shell morphology. However, the morphological features are greatly variable under different environmental conditions and hence taxonomic confusion usually exists when we use this mussel in FMWp. Trying to clarify this problem, we employed the molecular approaches, using the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) gene and the ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (ITS1), to re-identify the possible taxonomic characteristics of the mussel individuals that were believed to be different species of *A. woodiana*, *A. pacifica* or *A. elliptica* according to morphological features. Genetic distances were calculated based on the Kimura 2-parameter model, and in turn the neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was constructed. For purpose of comparison, the ND1 and ITS1 sequences of *Cristaria plicata* from NCBI GeneBank were co-analyzed with those of the mussels in this study. The largest intraspecific genetic distances among all studied mussels were 0.087 by the ITS1 gene and 0.0082 by the ND1 gene, which were much lower than those of the interspecific distances. The phylogenetic analysis results of our study suggest that *A. woodiana*, *A. pacifica*, and *A. elliptica* are likely to be the same species.

**Key words** ND1, ITS1, *Anodonta woodiana*, *Anodonta pacifica*, *Anodonta elliptica*, Species identification