

## 단감나무로부터 분리한 탄저병 병원균 *Colletotrichum* spp.의 RAPD와 PCR-RFLP를 이용한 유연관계 분석

김희종<sup>1</sup> · 엄승희 · 이윤수\*

<sup>1</sup>농우 바이오, 강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

*Colletotrichum* spp.는 광범위한 기주범위를 갖는 다범성균으로 각종 작물에 피해를 주는 중요한 식물병원진균이다. 최근 국내에서 널리 재배되고 있는 단감, 사과, 복숭아, 포도 등에 탄저병이 발생하여 많은 경제적 손실을 초래하고 있다. 탄저병원균의 경우 기존에는 주로 형태적 특징이나 배지 상에서의 특성, 기주에 대한 병원성의 차이에 의존하여 분류를 해 왔다. 그러나 최근에는 병원균의 분류에 있어 문제점을 해결하기 위하여 분자생물학적 방법을 이용하고 있다. 이에 본 실험에서는 Random Amplified Polymorphism DNAs (RAPD)와 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) 기법을 이용하여 단감나무에 탄저병을 일으키는 균들 간에 유연관계를 밝혔다. 유연관계 분석결과 크게는 2개의 그룹으로 나뉘었고 작게는 5개의 그룹으로 나뉘는 것을 알 수 있었다.

**Key words** □ *Colletotrichum* spp., PCR, PCR-RFLP, RAPD

국내의 단감나무 재배는 단감의 특유한 맛과 농가의 수익성 보장 등으로 인하여 1980년에 2,700 ha에 불과했던 것이 98년 현재 국내 단감의 재배면적은 23,500 ha, 생산량은 208,900 M/T 으로서 급격히 늘고 있는 실정이다. 주요 단감 품종으로 서촌, 부유, 대안 등이 재배되고 있으며, 이중 부유 품종이 전체의 81.5%를 점유하고 있다. 단감나무의 계속적인 재배면적의 증가와 단일 품종의 편중 등의 원인으로 1990년부터 주요 재배지인 경상남·북도와 전라도에 걸쳐 이제까지 문제시 되지 않았던 *Colletotrichum* spp.에 의한 단감나무 탄저병이 빈발하고 있으며, 이 병원균은 감나무를 비롯하여 넓은 기주범위를 가지고 있고, 이로 인한 과실의 생육저하와 수세의 악화 및 이듬해의 개화에 심한 악영향이 문제시 되고 있다(1,23,25). 탄저병은 주로 잎, 줄기, 또는 과실에 발생하는데, 짙은색의 점무늬를 형성하거나 가장자리가 약간 융기되고 안쪽은 다소 들어간 특징적인 병반을 형성한다. 탄저병원균의 경우 과실에 침입하면, 탄저병은 흔히 긴 잠복기를 갖는다. 과수의 경우, 병반은 융기하고 표면이 코르크처럼 되며 과실에 발생하는 탄저병은 흔히 낙과 및 과실부패를 일으킨다(12,21). 이병된 조직으로부터 순수 분리한 병원균은 포자의 형태와 균사생장의 차이에 따라 병원균을 분류하였고(2, 8), 최근에는 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 병원균 분리동정이 가능하게 되어서 PCR을 이용한 분자생물학적 방법을 도입하였다(9). PCR에 의한 fungal genome의 특별한 부위의 증폭은 병원균의 사전적인 여러 가지 분리·동정분류보다도 훨씬 빠르고 민감한 data를 제공하는 기술로서 매우 유용하며

동일한 속에 속하는 균주들의 유연관계분석에 유용하게 이용되고 있다(4,5,6,14,20). 이에 본 연구에서는 Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPD)분석과 균의 Internal Transcribed Spacer (ITS)지역을 증폭, 제한효소처리에 의한 band pattern을 확인하는 PCR-RFLP 기법을 이용하여 단감나무에 탄저병을 일으키는 탄저병원균간의 유연관계를 밝히고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### *Colletotrichum* 균 분리 및 배양

1998년 9월부터 11월 사이에 경주, 경남 창녕, 창원, 밀양 및 김해 등지에서 이병과일을 채집하여 이병 조직을 표면 소독 후 PDA (Potato Dextrose Agar)배지에 치상하여 자라 나온 균사 선단 부분을 분리하여 약 170여 균주를 분리하였다(Table 1). 분리된 균주들을 PDA에서의 배양적 특성에 따라 분리하였다. 실험을 수행하기 위하여 PDA 배지에서 7일간 배양한 균주를 PDB (Potato Dextrose Broth)배지에 cork-borer를 이용하여 접종하여 25°C에서 15일간 120 rpm으로 진탕배양 하였다.

#### Genomic DNA의 분리

*Colletotrichum*의 genomic DNA는 기존의 방법을 변형하여 추출하였다(5,6,11,18,19,27). 먼저 genomic DNA 추출하기 위해서 PDB 배지에서 15일간 배양한 후 광목천으로 각 균주의 균사를 거른 후 균사의 배지 성분을 제거하기 위해 멸균수로 2-3회 세척, 균사를 동결건조 하였다. 동결건조된 균사를 액체질소를 이용하여 마쇄하고 마쇄한 균사 5 g에 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 3% sodium dodecyl

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 033-250-6417, Fax: 033-243-3314  
E-mail: younslee@kangwon.ac.kr

**Table 1.** Isolates of *Colletotrichum* spp. from various sources

Group No.	Isolate No.	Isolate Name
G-1	1	Kyungju 1
	2	Kyungju 2
	3	Kungju 3y
	4	Kyungju 5
	5	Kimhae 3
	6	Kimhae 10
G-1-1	7	Changyung 17
	8	Kimhae 11
	9	Kimhae 27
	10	Milyang 18
	11	Milyang 19
	12	Milyang 20
	13	Changwon 3
	14	Changwon 15
	15	Changwon 29
G-2	16	Milyang 11
	17	Kimhae 22
	18	Kyungju 6
	19	Changwon 4
	20	Changwon 8
	21	Chanwon 19
	22	Milyang 7
	23	Changwon 27
	24	Changnyung 16
	25	Changnyung

sulfate; 1% 2-mercaptoethanol)를 이용하여 추출하였고, DNA를 0.8% agarose gel에 loading하여 이미 농도를 알고 있는 lambda DNA를 기준하여 농도를 확인하였다.

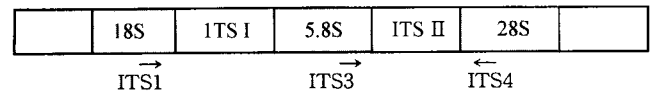
## RAPD

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 분석을 통하여 *Colletotrichum* 균주의 각 균주간 다형화현상과 maker를 찾아 보기 위해 operon random primer (10-mer)를 실험에 사용하였다 (Table 2). PCR 반응은 1×reaction buffer, 200 μM dNTPs, 1 unit *Taq* polymerase, 2.5 μM primer, 10 ng DNA의 조성으로 최종 20 μl의 양으로 수행하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 초기 완전변성시킨 후, 94°C에서 1분, 35°C에서 1분, 72°C에서 2분간을 한 cycle로 총 45회 반복하고 72°C에서 10분간 반응시킨 후, 4°C에서 보관하였다. 증폭된 PCR산물은 0.5×TBE (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA) buffer를 사용하여 1.5% agarose gel에서 2시간 동안 전기 영동한 후 UV 상자에서 전개된 DNA 단편들의 양상을 관찰하였다.

**Table 2.** List of primers (10-mer) and their base sequences used for RAPD analysis

Primer No.	Base sequences (5' to 3')	No. of bands
OPB-2	TGATCCCTGG	12(10) <sup>a</sup>
OPB-3	CATCCCCCTG	14(11)
OPB-4	GGACTGGAGT	13(10)
OPB-5	TGCGCCCTTC	8(6)
OPB-6	TGCTCTGCCC	9(8)
OPB-7	GGTCACGCAG	6(3)
OPB-8	GTCCACACGG	14(11)
OPB-9	TGGGGGACTC	11(8)
OPB-10	CTGCTGGGAC	11(1)
OPB-11	GTAGACCCGT	13(10)
Total		111(78)

<sup>a</sup>The numbers in the parentheses are the numbers of polymorphic bands in each.



© Primer ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'  
 ITS 3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'  
 ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

**Fig. 1.** rRNA gene structure in the repeat unit of a portion of the rDNA repeat showing the location of oligonucleotide primer site used to amplify rDNAs from *R. solani*.

## rDNA의 ITS, ITSII 영역의 PCR-RFLP

rDNA의 noncoding region ITS (I+II)영역을 증폭하기 위하여 White의 방법에 따라 실시하였다(28) (Fig. 1). PCR반응은 1× reaction buffer, 200 μM dNTPs, 1 unit *Taq* polymerase, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM primers를 첨가하여 전체량을 100 μl로 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 초기 변성시킨후, 95°C에서 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 cycle로 총 35 cycle을 반복하고 72°C에서 10분간 반응시킨 후 반응을 종료하였다. ITS (I+II)영역의 증폭을 확인한 후, 이 지역의 염기서열 차이를 확인하기 위해 제한효소로 절단 양상을 관찰하였다. ITS II영역의 절단인식 부위를 갖고 있는 제한효소를 선별하기 위하여 4 bases를 인식하는 *MspI*, *HhaI*, *HaeIII*, 5 bases를 인식하는 *HinfI*, 그리고 6 bases를 인식하는 *BamHI*, *EcoRI* 등의 제한효소를 이용하여 최종 20 μl (PCR product 9 μl, 10·enzyme buffer 2 μl, Enzyme 1 μl, dH<sub>2</sub>O 8 μl)로 하여 각 제한효소의 최적 반응온도에서 반응시킨 후 3% MetaPhor™ agarose gel (FMC Bioproducts, USA)에 전기영동을 하여 각 균주 간의 다형화현상을 비교하였다.

결과 및 고찰

*Colletotrichum* spp.는 광범위한 기주범위를 갖는 다병성균으로 특히 과실에 많은 피해를 주어 문제시 되고 있는 중요한 식물병원진균이다. 최근 국내에서 널리 재배되고 있는 단감, 사과, 복숭아, 포도 등에 탄저병이 발생하여 많은 경제적 손실을 초래하고 있다(3,7,10,17,29). 탄저병원균의 경우 기존에는 주로 형태적 특징이나 배지상에서의 특성, 기주에 대한 병원성의 차이에 의존하여 분류를 해 왔다(24). 그러나 최근에는 병원균의 분류에 있어 문제점을 해결하기 위하여 형태적 특성, 배양적 성질 및 병원성 뿐만 아니라 최근에 널리 이용되고 있는 분자생물학적 방법을 이용하고 있으므로 탄저병원균의 분류 및 동정에도 분자생물학적인 방법을 도입하여 재정리할 필요성이 요구되고 있다(3,7,10,17,29). 최근에 분자생물학적 방법으로는 RFLP, RAPD 및 rDNA를 이용한 핵산의 차이로 병원균의 분류 및 동정을 많이 하고 있다(13,15,26,28).

RAPD는 염기의 수가 9~12-mer 정도의 짧은 short oligonu-

cleotide primers를 이용하여 genomic DNA에 무작위로 배열되어 있는 부위를 증폭하는 PCR로 증폭후 산물은 전기영동상에서 관찰할수 있는 방법으로서 이때 나타나는 다형화 현상은 genomic DNA에서 primer 증폭부위의 삽입(insertion), 결실(deletion)등에 의해 나타난다. 이 방법은 아주 간편하고 빠른 시간 안에 분석결과를 얻을 수 있어 많은 실험실에서 사용하고 있는 방법이다(24). 이때 primer의 10-mer 중 GC 함량이 40%이상 있어야 하고 DNA 농도, Mg<sup>2+</sup>, polymerase 농도 및 denaturation 온도가 결과와 재현성에 영향을 미치는 요인이라고 한다. 그러나 RAPD의 기법은 재현성이 많이 떨어진다는 단점이 있는데 이를 극복하기 위하여 다른 기법의 활용이 요구되고있다(16,17).

이러한 다양한 분자생물학적인 시도 중에서도 리보솜 RNA 유전자의 염기서열에 근거한 계통분류가 가장 유력한 분류방법으로 간주되었다(12,15,16). 균류를 포함한 진핵생물의 ribosome RNA 유전자의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S rDNA의 차례로 2개의 internal transcribed spacer (ITS)로 분리 연결되어 있다. 초기에는 5.8S 부위에 대한 sequences의 비교가 분류의 근거로 주로

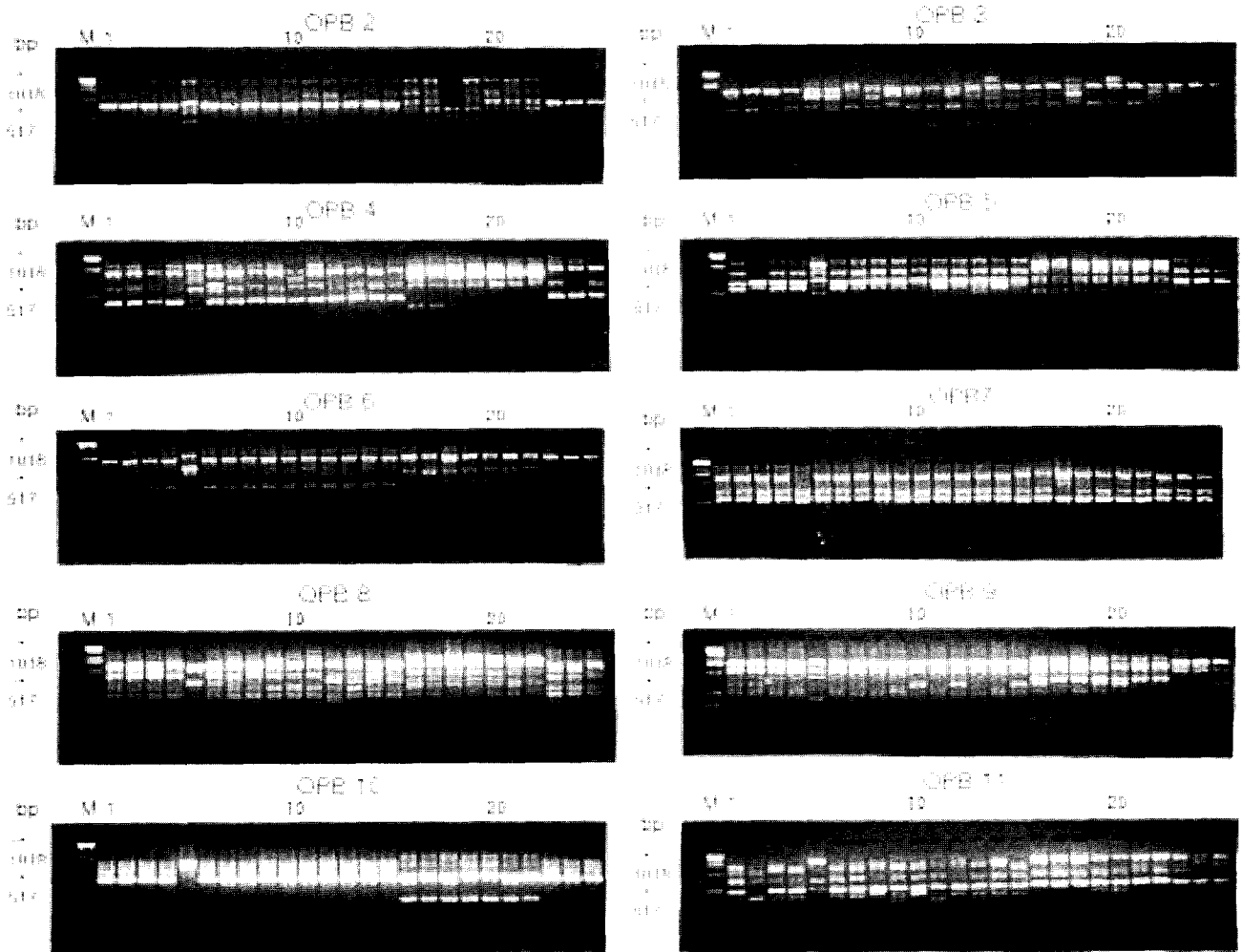


Fig. 2. PCR amplified genomic DNAs from the twenty five isolates of *Colletotrichum*. The numbers on top of the lane indicate isolate numbers in Table 1.

이용되었지만 이 부위는 염기수가 120개 전후로 길이가 상당히 짧고 매우 보존적인 부위이기 때문에 관련된 종들 사이에서는 거의 동일한 sequences를 나타내므로 이들 상호간의 구별을 위한 분류에서는 사용 될 수 없는 난점이 있었다. 그러나 18S 및 28S rDNA는 통계적으로 신뢰성이 있는 정보를 가지고 있으며, 염기보존이 높은 부분, 중간정도의 부분, 변이가 심한 부분이 공존하므로 계통분화를 논하는데 적합한 수단으로 취급되었다. 그러나 18S와 28S는 각각 1,600 bp와 3,300-4,800 bp로 그 전 염기서열을 결정하는 것은 많은 시간과 노력을 요구하고, 부분 염기서열은 보다 광범위한 계통발생학적 진화관계를 가지는 속간의 비교에는 대상으로 하는 염기서열의 부족으로 분류지표로 이용될수 있는 정보량이 적은 난점이 지적되었다 (18,21).

ITS I+II는 가운데 5.8S를 포함하여 500 bp 정도로, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 그 분자진화속도가 빨라 염기서열의 다양성을 요구하는 종, 속의 분류에 적합하다. 더구나, 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 각각의 비교가 가능하며, 이러한 풍부한 정보량과 간편성으로 동일속내의 종간 및 속간의 유연관계의 연구에 유용한 수단이 되어왔다(10,11,23).

본 실험에서는 RAPD, PCR-RFLP의 기법을 이용하여 탄저병 원균의 유연관계를 밝히고자 하였다. RAPD의 실험결과, 같은 그룹 내에서의 차이를 구분하기는 힘들었고(Fig. 2), PCR-RFLP의 경우도 같은 그룹에 속하는 종의 경우 band pattern의 차이를 구분하기가 어려웠다(Fig. 4).

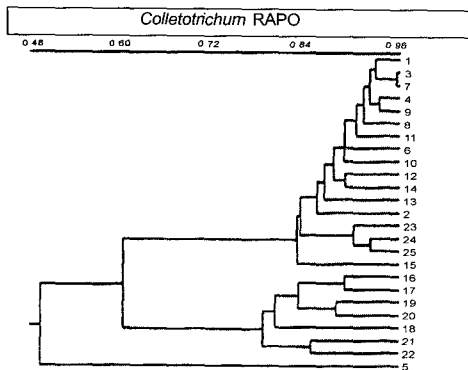


Fig. 3. UPGMA dendrogram among the twenty-five *Colletotrichum* spp. based on the bands on 1.5% agarose gel in RAPD.

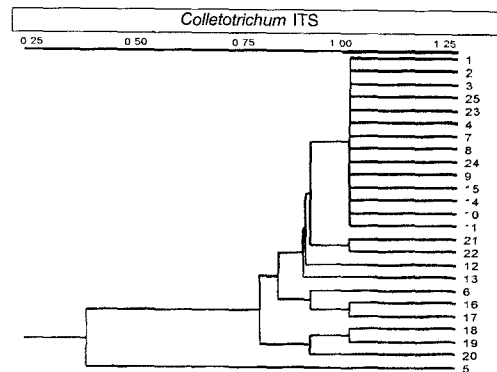


Fig. 5. UPGMA dendrogram among the twenty-five *Colletotrichum* spp. based on the bands on 1.5% agarose gel in PCR-RFLP (ITS I+II).

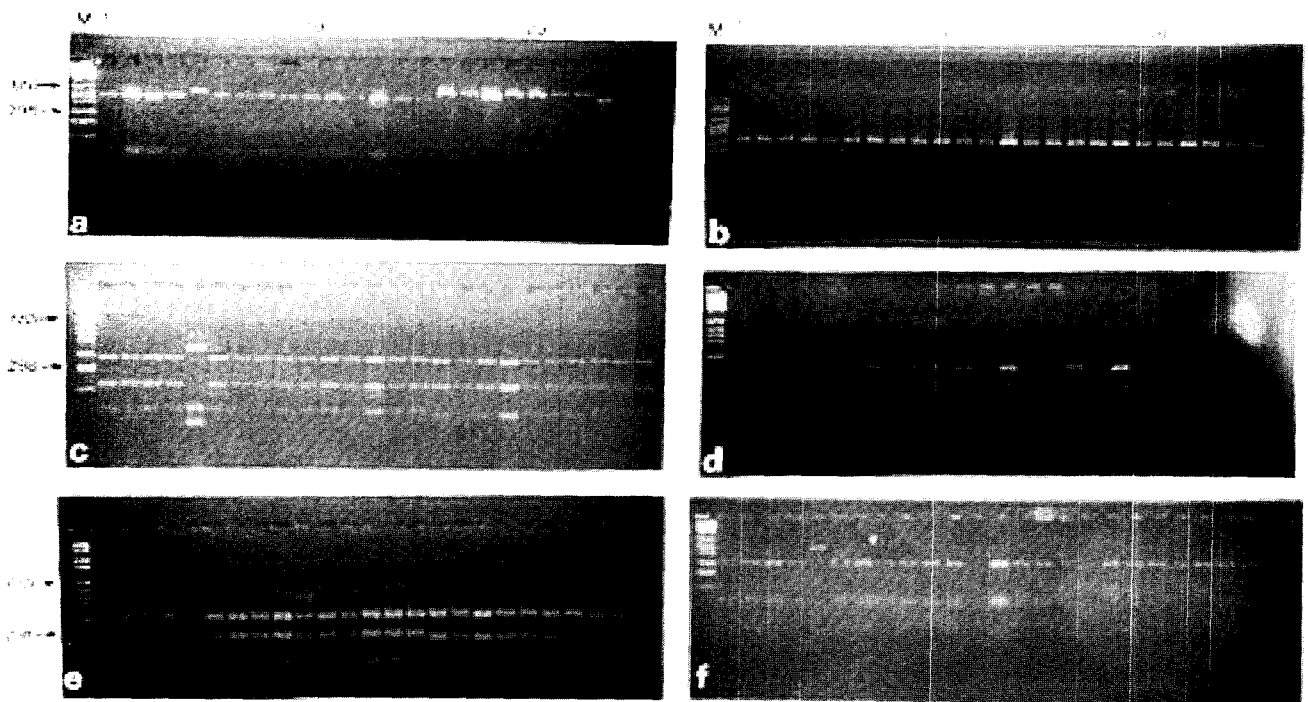


Fig. 4. Restriction fragment length polymorphism of *Colletotrichum*. rDNA-ITS (I+II) amplification products were digested with *Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, and *Msp*I. The numbers on top of the lane indicate isolate numbers in Table 1.



탄저병원균은 크게는 2개의 그룹으로, 작게는 5개의 그룹으로 나뉘어지는 것을 알 수 있었다. 경주1, 경주3, 경주5, 창원15, 경주2등은 첫 번째 그룹으로, 김해10, 창녕7, 김해11, 밀양1, 창원3, 창원27, 창녕16, 창녕, 김해27, 창원29는 두 번째 그룹으로, 밀양19, 밀양 20은 세 번째 그룹으로, 밀양11, 창원4, 밀양 7, 창원8, 경주6,은 4번째 그룹으로, 김해2, 창원19는 5번째의 그룹으로 나뉘어졌다(Fig. 3, 5).

큰 그룹에 속하는 균들의 상동성은 높게는 0.97이었고 낮게는 0.76의 scale로 나타났으며, 다른 그룹에 속하는 균들의 경우 0.38-0.52정도의 scale로 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다 (Table 3, 4). 이로서 단감나무에 탄저병을 일으키는 균의 경우 크게는 2가지의 균이 복합적으로 나타난 것을 알 수 있었다.

### 참고문헌

- Agrios, G.N. 1998. Plant pathology. Academic Press p. 331-333.
- Agostini, J.P., L.W. Timmer, and D.J. Mitchell. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathol.* 82, 1377-1382.
- Breithwaite, K.S., J.A.G. Irwin, and J.M. Manners. 1990. Restriction fragment length polymorphism in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in Australia. *Mycol. Res.* 94, 1129-1137.
- Chen, W. 1992. Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. *Phytopathol.* 82, 1467-1472.
- Choi, H.S., K.S. Kim, M.J. Kim, and Y.S. Lee. 1997a. RAPD analysis for the evaluation of genetic diversity among the *Fusarium* species from various sources. *Kor. J. Mycol.* 25, 202-208.
- Choi, H.S., K.S. Kim, and Y.S. Lee. 1997b. Molecular analysis of genetic diversity among the *Fusarium oxysporum* and their forma specialis from various sources. *J. Agricul. Sci.* 8, 29-36.
- Dresler-Nurmi, A., Z. Terefework, S. Kaijalainen, K. Lindstrom, and A. Hatakka. 2000. Silver stained polyacrylamide gels and fluorescence-based automated capillary electrophoresis for detection of amplified fragment length polymorphism patterns obtained from white-rot fungi in the genus *Trametes*. *J. Microbiol. Methods* 41, 161-72.
- Gunnell, P.S. and W.D. Gubler. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycol.* 84, 157-165.
- Hodson, A., P.R. Mills, and A.E. Brown, 1993. Ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from tropical fruits. *Mycol. Res.* 97, 329-335.
- Innis, M.A. and D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PCRs. p. 3-12, In, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds.), PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, New York.
- Lee, Y.S., H.S. Choi, and K.S. Kim, 1998. Analyses of genetic relationships of *Rhizoctonia solani* isolated from various crop species and rapid identification of anastomosis group with RAPD method. *Kor. J. Mycol.* 26, 373-379.
- Mesquita, A.G.G., T.J. Jr. Paula, M.A. Moreira, and E.G. de Barros, 1998. Identification of races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the aid of PCR-based molecular markers. *Plant Dis.* 82, 1084-1087.
- Nazar, R.N., X. Hu, J. Schmidt, D. Culham, and J. Robb. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 1-11.
- Old, R.W. and S.B. Primrose. 1994. Polymerase chain reaction p. 178-190. In, Principles of gene manipulation. Blackwell Science, Inc. Cambridge, MA. USA. 473p.
- O' Donnell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella Pulicaris*). *Curr. Genet.* 22, 213-220.
- Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85, 985-993.
- Mills, P.R., S. Sreenivasaprasad, and A.E. Brown. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *REMS Microbiol. Lett.* 98, 137-144
- Raeder, V. and P. Broda. 1987. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1, 17-20
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Manitis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. (2nd ed.) Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. NY.
- Schilling, A.G., E.M. Moller, and H.H. Geiger. 1996. Polymerase Chain Reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathol.* 86, 515-522.
- Sreenivasaprasad, S., A.E. Brown, and P.R. Mills. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41, 265-281.
- Sreenivasaprasad, S., K. Sharada, A.E. Brown, and P.R. Mills. 2000. PCR-based detection of *Colletotrichum acuatium* on strawberry. *Plant Pathol.* In press.
- Vaillancourt, L.J. and R.M. Hanau. 1992. Genetic and Morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. *Exp. Mycol.* 16, 219-2293.
- Vakalounakis, D.J. and G.A. Fragkiakakis. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathol.* 89, 161-168.
- Vilarinhos, A.D., T.T., Jr. Paula, E.G. Barros, and M.A. Moreira. 1995. Characterization of races of *Colletotrichum lindemuthianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. *Braz. Phytopathol.* 20, 194-198.
- Verbeet, M.P., J. Klootwijk, H. Heerikhuizen, R. Fontijn, E. Vrengdenhil, and R.J. Planta. 1983. Molecular cloning of the rDNA of *Saccharomyces rosei* and comparison of its transcription initiation region with that of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene* 23, 53-63.
- Wang, H., M. Qi, and A.J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21, 4153-4154.
- White, T.J., T. Burns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322, In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds.), PCR Protocols. Academic Press. San Diego. CA. USA.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.

(Received January 11, 2002/Accepted March 2, 2002)

---

**ABSTRACT: Analyses of Genetic Relationships of *Colletotrichum* spp. Isolated from Sweet Persimon with RAPD and PCR-RFLP.**

**Hee Jong Kim<sup>1</sup>, Seong Hee Eum, and Youn Su Lee\* (<sup>1</sup>Nong Woo Bio, Jeju, 690-210 Korea, Division of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-091, Korea)**

*Colletotrichum* species are important fungal pathogen that cause great damages on various host plant species worldwide. In Korea, *Colletotrichum* species cause massive economic losses on apple, peach, grape, and especially, sweet persimon productions. In the past, identification of the pathogen and the studies on the genetic relationships among the pathogenic isolates were mainly based on morphology, cultural characteristics, and the difference in pathogenicity. However, in recent years, these traditional methods have been replaced with molecular methods to solve the difficulty of classification on pathogens. Therefore, in this study, RAPD and PCR-RFLP methods were employed for the studies of genetic relationship among the different isolates of *Colletotrichum* species that cause damages on sweet persimon. As a results of genetic relationship analysis, *Colletotrichum* species tested were divided into two big groups or five small groups.