วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 9 ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม-ธันวาคม): 73-84, 2565
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 9, No. 2 (July-December): 73-84, 2022

Research article-ISSN: 2351-0846

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของไทย

Botanical Characteristics for Traditional Robusta Coffee in Lower Southern Region, Thailand

ปิยะนุช มุสิกพงศ์[1*], ชญานุช ตรีพันธ์[1], สุมาลี ศรีแก้ว[1], ศุภลักษณ์ อริยภูชัย[1], อรรถพล รุกขพันธ์[1], ฉัตรชัย กิตติไพศาล[1] และ ทรงเมท สังข์น้อย[2]

Piyanut Musigapong[1*], Chayanuch Tripan[1], Sumalee Srikaew[1], Suppaluck Ariyaphuchai[1], Auttapon Rukkaphan[1], Chatchai Kittipaisal[1] and Songmat Sungnoi[2]

[1] ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

[1] Trang Horticultural Research Centre, Horticultural Research Institute, Department of Agriculture

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 กรมวิชาการเกษตร

[2] Songkhla Agricultural Research and Development Center, Office of Agricultural Research and Development Region 8, Department of Agriculture

** Corresponding author: Piyanut191161@gmail.com*

Received 25 October 2022; Revised 13 December 2022; Accepted 23 December 2022

บทคัดย่อ

ศึกษากาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง เพื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีและวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ดำเนินการวิจัย ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ระหว่างเดือนตุลาคม 2563-กันยายน 2564 โดยสำรวจและรวบรวมกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมในจังหวัดกระบี่ สงขลา สตูล ตรัง และยะลา เก็บข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ ลักษณะเด่น และวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม จากการสำรวจและรวบรวมกาแฟแบ่งเป็น 2 โซน คือ ภาคใต้ฝั่งตะวันออก และฝั่งตะวันตก จำนวน 20 แหล่ง พบว่า กาแฟโรบัสตามีอายุตั้งแต่ 49-120 ปี การคัดเลือกกาแฟที่มีลักษณะดี คือ ข้อถี่ ความยาวข้อไม่เกิน 8 เซนติเมตร จำนวนผลต่อข้อมาก และขนาดผลใหญ่ สามารถคัดเลือกได้ 2 แหล่ง คือ 1) NSK3 ในพื้นที่อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา มีอายุ 102 ปี ลักษณะเด่น คือ มีจำนวนข้อ/กิ่งมาก ความยาวข้อสั้น จำนวนผล/ข้อ และขนาดผลใหญ่ เท่ากับ 11.3 ข้อ/กิ่ง 5.4 เซนติเมตร 16.9 ผล/ข้อ 1.9 และ 2.3 เซนติเมตร ตามลำดับ และ 2) ST3 ในพื้นที่อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล มีอายุ 95 ปี ลักษณะเด่น คือ มีจำนวนข้อ/กิ่งมาก ความยาวข้อสั้นและจำนวนผล/ข้อมาก เท่ากับ 11.3 กิ่ง/ข้อ 6.8 เซนติเมตร และ 29.0 ผล/ข้อ ตามลำดับ จากการเปลี่ยนยอดกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ พบว่า พันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด คือ TR1 ในพื้นที่อำเภอนาโยง จังหวัดตรัง เมื่อศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรม สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ใกล้ชิดกับกาแฟโรบัสตาพันธุ์ชุมพร 2 คือ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พันธุ์ SSK1 SSK2 SSK3 SSK4 (อ.สะบ้าย้อย จ.สงขลา), ST1 ST2 ST3 (อ.ควนโดน, ควนกาหลง จ.สตูล), TR1 (จ.ตรัง) และ YL1 (จ.ยะลา) สันนิษฐานว่าเป็นกลุ่มแรกที่นำมาปลูกในอำเภอสะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา แล้วมีการกระจายพันธุ์ด้วยเมล็ดทำให้มีพันธุกรรมที่ต่างไปจากเดิม

คำสำคัญ: การสำรวจ, พันธุกรรมพืช, ความหลากหลาย

Abstract

Study of traditional Robusta coffee in lower southern region was done for good variety selection and genetic relationship analysis. This experiment was carried out at Trang Horticultural Research Centre during October 2020 – September 2021. Traditional Robusta Coffee were surveyed and collected in Krabi, Songkhla, Satun, Trang and Yala Province for data collection of botanical characteristics, good variety and genetic relationship analysis. According to the survey from 2 zone in the Eastern and Western coast with the total of 20 sites, the Robusta coffee trees are 49-102 years old in range. To select coffee with good characteristics, high number of node frequencies, the length of node is not more than 8 cm, high number of fruit per nod and large fruit size are concerned. In this study, traditional Robusta coffee from two sites were selected. The first was NSK3 in the area of Na-Thawi District, Songkhla Province, the tree is 102 years old, number of node frequencies was 11.3 nodes/branch, short nod length

Published by Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: sjps.psu@gmail.com

was 5.4 cm. The numbers of fruit per nod was 16.9 fruits/nod and large fruit size of 2.3 cm. The second was ST3 in the area of Khuan-Kalong District, Satun Province, the tree is 95 years old, number of node frequencies was 11.3 nodes/branch, the nod length was 6.8 cm. and number of fruit per nod was 29.0 fruits/nod. The cleft grafting of Robusta coffee, it was found that TR1 has the highest percentage of survival. Genetic relationship study showed that Traditional Robusta coffee can be divided into 3 groups. Group 2 which includes SSK1, SSK2, SSK3, SSK4, ST1, ST2, ST3, TR1 and YL1, exhibit genetic similarity to Chumphon 2. This group is assumed to be the first group planted in Sa-ba-Yoi District, Songkhla Province. Deviated genetic could be resulted from seed propagation.

Keywords: Surveying, Plant genetic, Diversity

บทนำ

กาแฟโรบัสตา (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) เป็นพืชพื้นเมืองแถบเส้นศูนย์สูตรของทวีปแอฟริกา ระหว่างเส้นรุ้งที่ 10 องศาเหนือ ถึง 10 องศาใต้ ระดับความสูงตั้งแต่ 1,050 เมตร จากระดับน้ำทะเล พบมีการกระจายพันธุ์ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลตะวันตกของทวีปแอฟริกาจากประเทศเซเนกัล คีเนิ่น แซ่นร่า เลโดน ไลบีเรีย ไอวอรี่โคสต์ กาน่า ไนจีเรีย แคมเมอรูน กาบอง ซาอีร์ (คองโก) จนกระทั่งถึงฝั่งทะเลตะวันออกของทวีปขึ้นมาทางเหนือของทะเลสาบวิคตอเรียในเขตประเทศยูกันดาและภาคใต้ของซูดาน กระจายพันธุ์ค่อนข้างหนาแน่นในแถบแม่น้ำคองโกและลุ่มแม่น้ำคูอิลู แล้วได้แพร่กระจายไปยังยุโรปและเอเชียในเวลาต่อมา (Thavornrat, 2005) กาแฟพันธุ์โรบัสตาสันนิษฐานว่านำมาปลูกเมื่อ ปี พ.ศ. 2447 ชาวไทยอิสลามชื่อ นายตีหมุนเป็นผู้นำมาปลูกครั้งแรกที่ตำบลบ้านตะโหนด (ตำบลบ้านโหนดในปัจจุบัน) อำเภอสะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา มีการสันนิษฐานแหล่งที่มาของเมล็ดพันธุ์กาแฟแตกต่างกันออกไป 2 แหล่ง บางแหล่งว่านำมาจากประเทศอินโดนีเซีย เพราะช่วงนั้นประเทศอินโดนีเซียกำลังตื่นตัวการปลูกกาแฟโรบัสตาอีกแหล่งว่านำมาจากโอกาสไปแสวงบุญ ณ เมืองเมกกะ ประเทศซาอุดิอาระเบีย กาแฟที่นำมาปรากฏว่าปลูกได้ผลดีพอสมควร จากนั้นได้มีการขยายพันธุ์และมีการส่งเสริมการปลูกกาแฟโรบัสตาออกไปอย่างกว้างขวาง (Sriwat, 2016) ในสมัยจอมพลประภาส จารุเสถียร เป็นรัฐมนตรี ได้เล็งเห็นถึงความจำเป็นและความสำคัญของการปลูกและผลิตกาแฟขึ้นเองในประเทศ เพื่อลดดุลการค้าระหว่างประเทศ และมีนโยบายส่งเสริมเกษตรกรปลูกกาแฟใน 50 จังหวัด จนกระทั่งมีการปลูกแพร่กระจายในหลายจังหวัดของภาคใต้ รวมทั้งภาคอื่นๆ ของประเทศไทย (Department of Agricultural Extension, 2014) พื้นที่ปลูกกาแฟทั้งประเทศมีพื้นที่ลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากมีการปรับเปลี่ยนไปปลูกพืชยืนต้นอื่นไม่ว่าจะเป็นปาล์มน้ำมัน ยางพารา และทุเรียน ซึ่งในช่วง 5 ปีที่ผ่านมาเนื้อที่ให้ผลผลิตกาแฟของไทยลดลงจาก 365,337 ไร่ ในปี พ.ศ. 2552 เหลือ 294,983 ไร่ ในปี พ.ศ. 2556 เหลือพื้นที่ปลูก 279,060 ไร่ หรือลดลงร้อยละ 5.60 ต่อปี ผลผลิต 38,140 ตัน (Office of Agricultural Economics, 2013) กาแฟพันธุ์โรบัสตา ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา เนื้อที่ให้ผลผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ลดลง โดยเนื้อที่ให้ผลจากปี พ.ศ. 2553/54 (288,716 ไร่) ถึง พ.ศ. 2557/58 (189,281 ไร่) ลดลงร้อยละ 10.44 ส่วนผลผลิตจากปี พ.ศ. 2553/54 (37,055 ตัน) ถึง พ.ศ. 2557/58 (17,160 ตัน) ลดลงร้อยละ 15.72 และผลผลิตต่อไร่จากปี พ.ศ. 2553/54 (128 กิโลกรัม) ถึง พ.ศ. 2557/58 (91 กิโลกรัม) ลดลงร้อยละ 5.71 ขณะเดียวกัน ราคาเมล็ดกาแฟดิบในปี พ.ศ. 2554-2558 มีราคาลดลงร้อยละ 1.37 ต่อปี เนื่องจากเศรษฐกิจซบเซา ทำให้เกษตรกรเปลี่ยนไปปลูกพืชแซมอื่นๆ เช่น ยางพารา ปาล์มน้ำมัน และทุเรียน ปัจจุบันแหล่งปลูกกาแฟพันธุ์โรบัสตาที่สำคัญของไทยกระจายอยู่ใน 4 จังหวัดภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช มีพื้นที่ปลูกในปี พ.ศ. 2558 มีสัดส่วนร้อยละ 75 เมื่อเทียบกับเนื้อที่ปลูกทั้งหมด (Department of Agriculture, 2019) นับได้ว่ากาแฟมีความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากกาแฟโรบัสตามีการผสมข้ามต้น และการปลูกกาแฟในพื้นที่ภาคใต้มีการปลูกหลายยุค จึงมีการขยายวงกว้างทั่วทั้งภาคใต้ ส่งผลให้กาแฟโรบัสตาเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ไม่สามารถประเมินทางด้านลักษณะสัณฐานวิทยาได้ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือ เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ได้รับความนิยมมาก สำหรับประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอย่างถูกต้องแม่นยำ (Aiumsumang and Phimphan, 2020)

ปัจจุบันกาแฟโรบัสตาได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งผู้ประกอบการแปรรูปกาแฟ และผู้จำหน่ายเครื่องดื่มกาแฟ ทั้งในรูปแบบผลิตภัณฑ์กาแฟผงกึ่งสำเร็จรูป (instant coffee) กาแฟคั่ว/บด (roasted/blended coffee) กาแฟสำเร็จรูปบรรจุกระป๋อง (canned instant coffee) การจำหน่ายในร้านกาแฟพรีเมียม (coffee premium) และกาแฟโบราณที่ได้รับความนิยมบริโภคอย่างกว้างขวางของคนไทย (Chiarawipa and Sirikantayakul, 2015) ซึ่งกาแฟโรบัสตาในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างบางพื้นที่ จากที่ได้มีการสัมภาษณ์เกษตรกร ในบางพื้นที่ทางภาคใต้มีการเก็บรักษาต้นกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมไว้ อายุไม่น้อยกว่า 50-80 ปี เป็นกาแฟชุดเดียวกับที่นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย ต้นกาแฟเหล่านี้ยังคงสามารถให้ผลผลิตทุกปี นับได้ว่าเป็นพืชที่ได้รับความนิยมและควรแก่การอนุรักษ์และฟื้นฟูเพราะนอกจากจะสร้างมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ให้เกิดรายได้แล้ว ยังสามารถพัฒนาเป็นพืชอัตลักษณ์ประจำถิ่น และการทราบถึงความเหมือนและความแตกต่างของข้อมูลทางพันธุกรรม สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการรักษาพันธุกรรมกาแฟ การ

ปรับปรุงพันธุ์ และการขยายพันธุ์ให้ได้กาแฟสายพันธุ์ดี เพื่อเพิ่มผลผลิตที่มีคุณภาพตามความต้องการได้ต่อไป เพื่อเป็นพืชทางเลือกกับเกษตรกรในภาคใต้ตอนล่างได้

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่ภาคใต้

ศึกษาค้นคว้าข้อมูลแหล่งเชื้อพันธุกรรมของกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง และวางแผนการสำรวจและรวบรวม แบ่งเป็น 2 โซน คือ 1) ภาคใต้ฝั่งตะวันออก ประกอบด้วย จังหวัดสงขลา และยะลา และ 2) ฝั่งตะวันตก ประกอบด้วย จังหวัดกระบี่ สตูล และตรัง จำนวนทั้งสิ้น 20 แหล่ง ซึ่งมีการบันทึกข้อมูลพิกัดแปลง ข้อมูลแหล่งปลูก ปีที่ปลูก และอายุต้น

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิม

จากการสำรวจและรวบรวมข้อมูลกาแฟโรบัสตาจากพื้นที่ต่างๆ จำนวน 20 แหล่ง ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างส่วนกิ่ง ใบ ผล สำหรับประเมินลักษณะความเป็นอัตลักษณ์ของกาแฟโรบัสตาจากแต่ละแหล่ง เกณฑ์ในการคัดเลือกกาแฟโรบัสตาที่มีลักษณะดีเบื้องต้น คือ ข้อถี่ ความยาวข้อไม่ควรเกิน 8 เซนติเมตร จำนวนผลต่อข้อมาก ขนาดผลใหญ่ ส่งผลให้ได้ผลผลิตสูง (Horticultural Research Institute, 2019) จึงมีการบันทึกข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ ประกอบด้วย ความยาวกิ่ง จำนวนข้อต่อกิ่ง ความยาวข้อ ขนาดความกว้างและยาวใบ จำนวนผลต่อข้อ และขนาดความกว้างและยาวผล มีการถ่ายภาพลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกาแฟโรบัสตา รวมทั้งนำส่วนกิ่ง ใบ และผลของแต่ละแหล่ง มาจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้ง บันทึกข้อมูลพืช และเลขสถานที่เก็บตัวอย่าง

3. ความสามารถในการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากการเปลี่ยนยอดกาแฟ

เพาะเมล็ดกาแฟพันธุ์โรบัสตา ให้ปุ๋ยและน้ำสม่ำเสมอ เมื่อต้นกาแฟที่ดำเนินการเพาะเมล็ด อายุ 1 ปี ดำเนินการคัดเลือกต้นที่มีความสมบูรณ์ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น ประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ลำต้นตรง ไม่โค้งงอ เพื่อนำมาเป็นต้นตอ สำหรับศึกษาความสามารถในการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากการเสียบยอดกาแฟพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้จากการสำรวจและรวบรวมจากพื้นที่ต่างๆ กิ่งกาแฟที่ได้จากการสำรวจต้องเป็นกิ่งกาแฟสดที่อยู่ในระยะเพสลาด ดำเนินการเปลี่ยนยอดกาแฟด้วยวิธีการต่อกิ่งแบบเสียบลิ่ม (Cleft graft) นำต้นกาแฟที่ผ่านการเปลี่ยนยอดมาดูแลรักษาในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ที่ดัดแปลงให้มีลักษณะคล้ายกระโจมชี้น หลังจากทำการเปลี่ยนยอดกาแฟ 1 เดือน ตรวจประเมินเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกาแฟ แล้วนำต้นที่เนื้อเยื่อมีการผสานเข้ากันดีและมีการแตกยอดใหม่ออกจากถุงพลาสติก เมื่อกาแฟต้นโตมีการเปลี่ยนขนาดถุงตามความเหมาะสม ดูแลรักษาให้ปุ๋ยและน้ำสม่ำเสมอ ซึ่งต้นกาแฟที่รอดชีวิตจากการเปลี่ยนยอดจะเป็นตัวแทนพันธุกรรมกาแฟโรบัสตาจากพื้นที่ต่างๆ ในการอนุรักษ์พันธุ์ไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง

4. การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟโรบัสตา

จากสำรวจและรวบรวมข้อมูลกาแฟจากพื้นที่ต่างๆ มีการเก็บตัวอย่างใบกาแฟสดในระยะเพสลาด เพื่อนำมาวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟโรบัสตา ตามรายละเอียด ดังนี้

1. สกัดดีเอ็นเอจากใบกาแฟ นำตัวอย่างใบกาแฟประมาณ 0.2 กรัม บดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM EDTA, 1.5 M NaCl, 2% CTAB และ 2% B-mercaptoethanol) 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กลับหลอดเบาๆ ทุกๆ 10 นาที จากนั้นนำไปเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนและเอาเนื้อเยื่อที่ถูกย่อยออก ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 1 เท่าของส่วนใส กลับหลอดเบาๆ และนำไปเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่อีกครั้ง (ระมัดระวังในขั้นตอนการดูดส่วนใส ไม่ให้มีส่วนของ organic layer interface ติดไป) เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 0.5 เท่าของส่วนใส กลับหลอดเบาๆ และเติม เอทานอลเย็นความเข้มเข้ม 95 เปอร์เซ็นต์ 3 เท่าของปริมาตรทั้งหมด กลับหลอดเบาๆ ตกตะกอนดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเซนติฟิวส์นาน 10 นาที ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ และค่อยๆ เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 800 ไมโครลิตร เทเอทานอลทิ้ง และตากตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที หรือจนกว่า DNA จะแห้งสนิท ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH7.6, 0.1 mM EDTA) 50 ไมโครลิตร (ดัดแปลงจาก Healey *et al*., 2014)

2. หาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำไมโครแซทเทลไลท์ จากไพรเมอร์ดังต่อไปนี้ จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ CCRM-14, CCRM-17, CCRM-19, CCRM-33, CCESSR-05, CCESSR-14, CCESSR-22 และ CCESSR-41 (Prasad and Ramesh, 2014)

3. นำมาดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณโดยใช้วิธีพีซีอาร์ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที 1 รอบ

4. นำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ปริมาณ 5 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้น LE agarose ที่มีความเข้มข้น 3% ละลายใน TBE buffer ใช้แรงเคลื่อนฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 70 นาที

5. ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที จุ่มแช่ในน้ำกลั่น 15 นาที

6. ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวแทนกลุ่มประชากร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สำรวจกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่ภาคใต้

จากที่ได้สำรวจกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่ภาคใต้ สามารถแบ่งพื้นที่เป็น 2 โซน คือ ภาคใต้ฝั่งตะวันออก และภาคใต้ตะวันตก (Figure 1) คือ 1) ภาคใต้ฝั่งตะวันออก จังหวัดที่ได้มีการสำรวจกาแฟ ที่เป็นแหล่งปลูกกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิม จำนวน 2 จังหวัด คือ สงขลา และยะลา โดยจังหวัดสงขลา ได้สำรวจ 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1) พื้นที่อำเภอนาทวี จำนวน 4 แหล่ง มีอายุตั้งแต่ 60 80 102 และ 105 ปี ตามลำดับ และ 2) พื้นที่อำเภอสะบ้าย้อย จำนวน 5 แหล่ง มีอายุ 50 80 100 120 และ 120 ปี ตามลำดับ และจังหวัดยะลา พื้นที่อำเภอธารโต จำนวน 1 แหล่ง มีอายุ 70 ปี และ 2) ภาคใต้ฝั่งตะวันตก จังหวัดที่ได้มีการสำรวจกาแฟ ซึ่งเป็นแหล่งปลูกกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิม จำนวน 3 จังหวัด คือ กระบี่ ตรัง และสตูล โดยจังหวัดกระบี่ คือ พื้นที่อำเภอลำทับ จำนวน 5 แหล่ง มีอายุ เท่ากับ 49 ปี ทั้ง 5 แหล่ง จังหวัดตรัง พื้นที่อำเภอนาโยง จำนวน 1 แหล่ง อายุ 60 ปี และจังหวัดสตูล พื้นที่อำเภอควนโดน จำนวน 2 แหล่ง มีอายุตั้งแต่ 70 และ 80 ปี และพื้นที่อำเภอควนกาหลง จำนวน 2 แหล่ง มีอายุ 80 และ 95 ปี

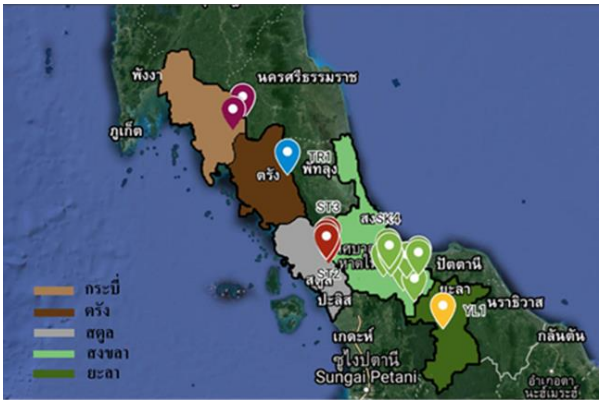


Figure 1 Traditional Robusta coffee plantation in lower Southern Region, Thailand

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิม

ข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์เบื้องต้นของกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิม จากจำนวน 20 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกต้นพันธุ์กาแฟโรบัสตาดั้งเดิมที่มีลักษณะดีได้ 2 ตัวอย่าง (Figure 2) คือ 1) NSK3 เป็นกาแฟที่ได้มีการสำรวจในพื้นที่ตำบลปลักหนู อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา ต้นที่ได้ทำการสำรวจมีอายุ 102 ปี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 46 เซนติเมตร ความสูงต้น 4 เมตร ความกว้างทรงพุ่ม 5.6 เมตร และความยาวทรงพุ่ม 6.6 เมตร สำหรับลักษณะเด่นของต้น คือ มีจำนวนข้อ/กิ่งมาก ความยาวข้อสั้น จำนวนผล/ข้อ ขนาดความกว้างผล และขนาดความยาวผลใหญ่ เท่ากับ 11.3 กิ่ง/ข้อ 5.4 เซนติเมตร 16.9 ผล/ข้อ 1.9 และ 2.3 เซนติเมตร ตามลำดับ และ 2) ST3 เป็นกาแฟที่ได้มีการสำรวจในพื้นที่บ้านโตนปาหนัน ตำบลทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล ต้นที่ได้ทำการสำรวจมีอายุ 95 ปี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 61 เซนติเมตร ความสูงต้น 0.8 เมตร ความกว้างทรงพุ่ม 7.5 เมตร และความยาวทรงพุ่ม 7.5 เมตร สำหรับลักษณะเด่นของต้น คือ มีจำนวนข้อ/กิ่งมาก ความยาวข้อสั้น และจำนวนผล/ข้อมากสุด เท่ากับ 11.3 กิ่ง/ข้อ 6.8 เซนติเมตร และ 29.0 ผล/ข้อ ตามลำดับ

3. ความสามารถในการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากการเสียบยอด

จากที่ได้มีการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเสียบยอด เพื่อรักษาพันธุกรรมกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมไว้ พบว่า กาแฟที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจากการเสียบยอด คือ TR1 ซึ่งเป็นกาแฟที่ได้จากพื้นที่ตำบลช่อง อำเภอนาโยง จังหวัดตรัง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ DD2 ได้จากพื้นที่ตำบลคลองท่อมเหนือ อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ และ YL1 ได้จากพื้นที่ตำบลธารโต อำเภอธารโต จังหวัดยะลา มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

4. การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟ

จากการวิเคราะห์พันธุกรรมของกาแฟ จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยมีการเปรียบเทียบด้วยกาแฟโรบัสตาพันธุ์ชุมพร 2 จำนวน 1 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ ซึ่งผ่านการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ จากทั้งหมด 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (Figure 3)

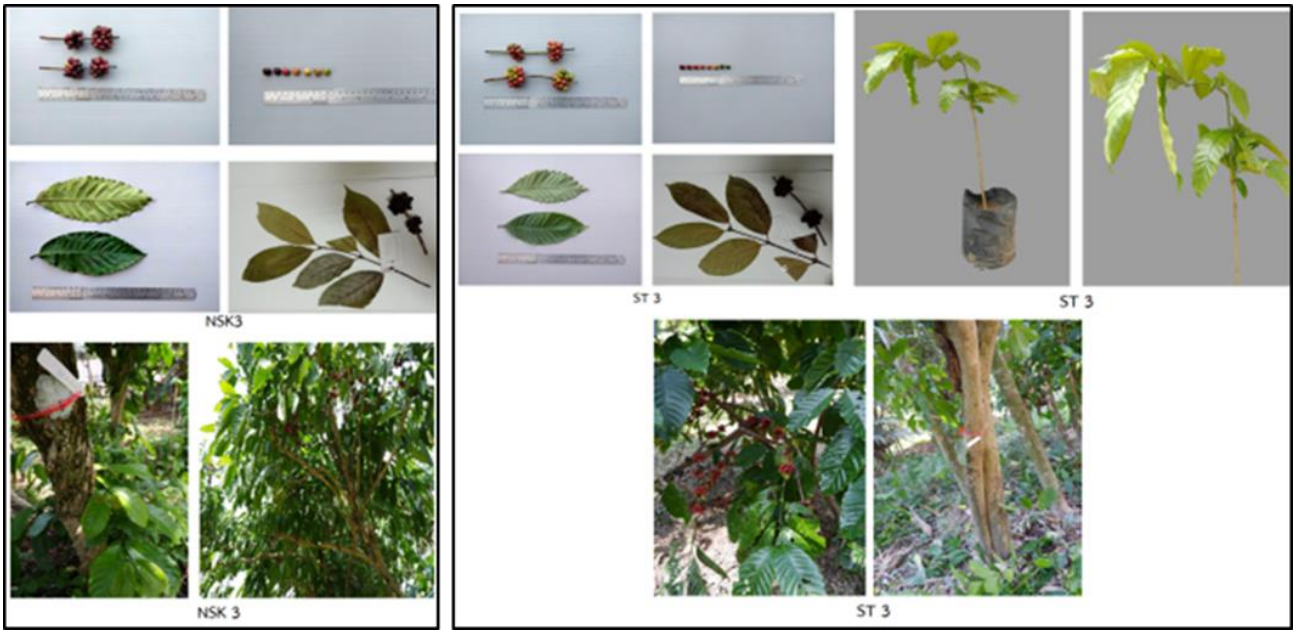


Figure 2 Botanical characteristics of good Robusta coffee consist of: NSK3 from Plak Noo Subdistrict, Na Thawi District, Songkhla Province and ST3 from Thung Nui Subdistrict, Khuan Ka Long District, Satun Province

เมื่อวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟทั้งหมด 21 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทแทลไลท์ โดยใช้ 8 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ขนาดของแถบดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ 130-400 คู่เบส ไพรเมอร์แต่ละตำแหน่งให้แถบดีเอ็นเอ 2-5 แถบ (อัลลีล) โดยคู่ไพรเมอร์ CCRM-19 และ CCESSR-41 ให้จำนวนอัลลีลมากที่สุดคือ 5 อัลลีล และไพรเมอร์ CCRM-33 ให้จำนวนอัลลีลสูงสุด 4 แอลลีล คู่ไพรเมอร์ CCRM-14 CCRM-17 CCRM-19 CCRM-33 และ CCESSR-14 ให้จำนวนอัลลีลสูงสุด 3 คู่ และ MS1AAC-203 ให้จำนวนอัลลีลสูงสุด 3 แอลลีล และคู่ไพรเมอร์ CCESSR-22 ให้จำนวนอัลลีลน้อยที่สุด คือ 2 อัลลีล เมื่อวิเคราะห์เดนโดแกรมด้วยวิธี UPGMA cluster analysis ในโปรแกรม NTSYS (version 2.1) (Figure 4) พบว่า ดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกาแฟ จำนวน 21 สายพันธุ์ มีค่าระหว่าง 0.55-0.89 โดยคู่ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงที่สุดคือ กาแฟพันธุ์ SSK3 (หมายเลข 12) กับกาแฟพันธุ์ SSK4 (หมายเลข 13) โดยมีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.89 และพบค่า similarity coefficient ต่ำสุด เท่ากับ 0.55 ระหว่างพันธุ์ DD1 (หมายเลข 1) กับพันธุ์ NSK2 (หมายเลข 7) (Table 2) โดยจากผลการวิเคราะห์สามารถแบ่งกลุ่มกาแฟได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ รายละเอียดสมาชิกกลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์ DD1 (1) DD2 (2) DD4 (4) NSK1 (6) NSK3 (8) NSK4 (9) SSK5 (14) และ ST4 (18) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย SSK1 (10) SSK2 (11) SSK3 (12) SSK4 (13) ST1 (15) ST2 (16) ST3 (17) TR1 (19) YL1 (20) และ CP1 (21) และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย DD3 (3) DD5 (5) และ NSK2 (7)

ส่วนใหญ่กาแฟที่เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดเดียวกันจะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยพันธุ์ SSK1 SSK2 SSK3 และ SSK4 เป็นพันธุ์ที่เก็บรวบรวมมาจาก อำเภอสะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา พันธุ์ ST1 ST2 และ ST3 เป็นพันธุ์ที่เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดสตูล นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ TR1 และ YL1 ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดตรัง และยะลาอยู่ในกลุ่มนี้อีกด้วย ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับกาแฟโรบัสตาพันธุ์ชุมพร 2 (CP1) อาจสรุปได้ว่ากาแฟในกลุ่มที่ 2 เป็นกาแฟที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์ชุมพร 2 แต่อาจมีการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดที่มีการผสมข้ามต้น ทำให้มีพันธุกรรมที่ต่างไปจากเดิม สอดคล้องกับการรายงานของ Tummakat and Thanomthin (1986) ที่อธิบายว่า กาแฟพันธุ์โรบัสตาทุกต้นเป็นพันธุ์ทาง (heterozygous) โดยมีโครโมโซม 2n = 22 ซึ่งมีการผสมข้ามต้น เนื่องจากผสมตัวเองไม่ได้ เพราะจะไม่ติดเมล็ดหรือเป็นหมัน (self-sterile) ทำให้ผลกาแฟพันธุ์โรบัสตาเกือบทั้งหมดมาจากการผสมข้ามต้นที่อาศัยลมและแมลงในการช่วยผสมเกสร สันนิษฐานได้ว่ากาแฟกลุ่มที่ 2 เป็นกาแฟที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับกาแฟรุ่นแรก ที่นำเข้ามายังประเทศไทย แต่มีพันธุกรรมที่ต่างไปจากเดิมเพราะผสมข้ามต้นแล้วมีการนำเมล็ดมาปลูก

Table 1 Collection location, botanical characteristics and percentage of survival of traditional Robusta coffee in lower Southern Region, Thailand

code	Location collected	length of branch (cm)	number of node (nodes/branch)	length of node (cm)	leaf size (cm.)		number of fruit per nod (fruits/nod)	fruit size (cm.)		Percentage survived (%)
					Width of leaf	Length of leaf		Width of fruit	Length of fruit	
DD1 (1)	Khlong Thom Nuea Subdistrict, Khlong Thom District, Krabi Province	81.7	7.7	6.7	8.8	22.4	16.2	1.5	1.4	57.0
DD2 (2)	Khlong Thom Nuea Subdistrict, Khlong Thom District, Krabi Province	126.3	9.3	7.8	10.0	25.3	15.2	1.5	1.2	80.0
DD3 (3)	Khlong Thom Nuea Subdistrict, Khlong Thom District, Krabi Province	110.3	11.0	6.8	10.7	24.4	12.1	1.5	1.5	50.0
DD4 (4)	Khlong Thom Nuea Subdistrict, Khlong Thom District, Krabi Province	90.7	10.3	6.6	7.6	20.9	15.7	1.4	1.5	43.0
DD5 (5)	Khlong Thom Nuea Subdistrict, Khlong Thom District, Krabi Province	109.0	10.7	8.8	9.7	24.7	16.3	1.6	1.5	54.0
NSK1 (6)	Na Thawi Subdistrict, Na Thawi District, Songkhla Province	44.3	5.0	8.9	7.5	23.1	34.0	1.0	1.2	29.0
NSK2 (7)	Sa Khon Subdistrict, Na Thawi District, Songkhla Province	46.9	6.0	7.8	6.8	18.9	0.0	0.0	0.0	0.0
NSK3 (8)	Plak Noo Subdistrict, Na Thawi District, Songkhla Province	57.5	11.3	5.4	7.8	20.6	16.9	1.9	2.3	0.0
NSK4 (9)	Klong Sai Subdistrict, Na Thawi District, Songkhla Province	39.2	7.0	8.0	6.9	16.4	0.0	0.0	0.0	20.0
SSK1 (10)	Sabayoi Subdistrict, Sabayoi District, Songkhla Province	60.1	10.3	6.1	9.2	19.9	9.9	1.1	1.20	0.0
SSK2 (11)	Khuha Subdistrict, Saba Yoi District, Songkhla Province	49.7	5.3	9.6	10.11	20.3	0.0	0.0	0.0	33.0
SSK3 (12)	Sabayoi Subdistrict, Sabayoi District, Songkhla Province	69.1	10.7	6.7	8.8	20.8	0.0	1.2	1.41	67.0
SSK4 (13)	Khao Daeng Subdistrict, Sabayoi District, Songkhla Province	57.5	7.0	8.6	10.0	20.7	13.2	1.2	1.4	0.0
SSK5 (14)	Ba Hoi Subdistrict, Sabayoi District, Songkhla Province	52.3	5.0	8.9	8.8	21.7	7.3	0.0	0.0	14.0
ST1 (15)	Wang Prachan Subdistrict, Khuan Don District, Satun Province	71.0	9.0	8.3	10.7	26.8	0.0	0.0	0.0	25.0
ST2 (16)	Wang Prachan Subdistrict, Khuan Don District, Satun Province	62.7	8.3	7.8	8.8	20.2	12.0	1.0	1.2	43.0
ST3 (17)	Thung Nui Subdistrict, Khuan Ka Long District, Satun Province	75.3	11.3	6.8	9.0	22.4	29.0	0.9	1.2	33.0
ST4 (18)	Thung Nui Subdistrict, Khuan Ka Long District, Satun Province	66.0	12.7	5.1	5.9	18.0	4.7	2.1	1.1	0.0
TR1 (19)	Chong Subdistrict, Na Yong District, Trang Province	69.7	6.7	10.5	10.0	24.2	4.9	1.0	1.30	85.0
YL1 (20)	Than To Subdistrict, Than To District, Yala Province	55.5	7.3	7.8	8.4	18.2	8.6	1.1	1.2	80.0

นอกจากนี้ มีการอธิบายว่า ได้มีการนำเข้ากาแฟโรบัสตามาปลูกครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2447 โดยนายดีหมุน คนไทยที่นับถือศาสนาอิสลามได้ไปแสวงบุญ ณ เมืองเมกกะ ประเทศซาอุดิอาระเบีย ได้นำเมล็ดพันธุ์กาแฟพันธุ์โรบัสตามาเพาะปลูกที่บ้าน คือ ตำบลบ้านโหนด อำเภอสะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา (Thavornrat, 2005) ส่วนกาแฟที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดกระบี่ และอำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา กระจายอยู่ในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 เป็นกาแฟโรบัสตาพันธุ์อื่นๆ ที่ยังไม่สามารถชี้ชัดได้

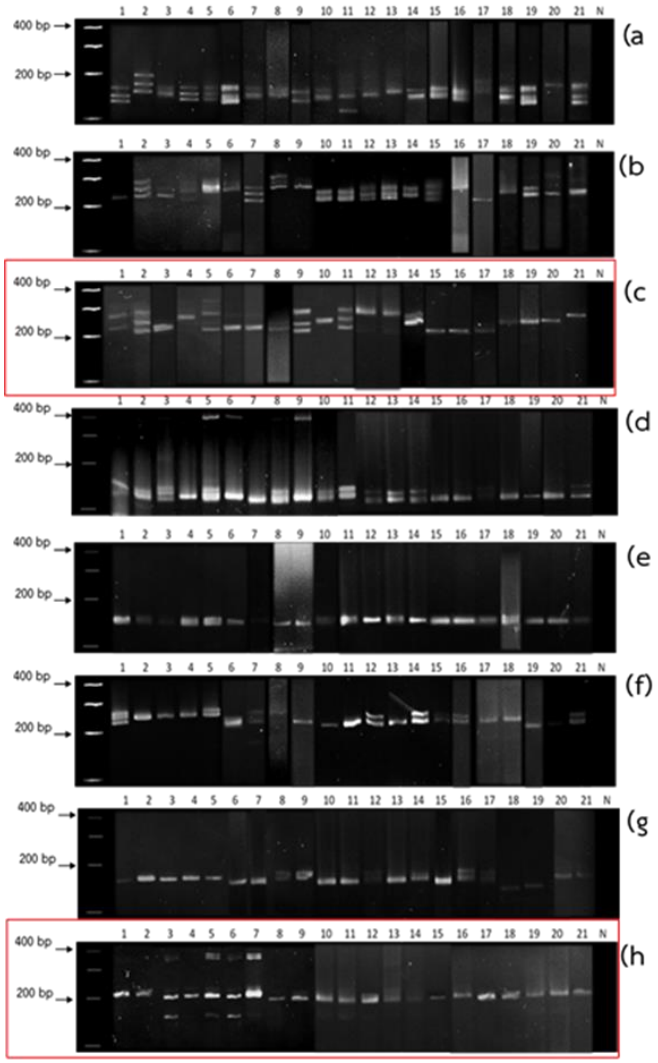


Figure 3 DNA bands of coffee among 21 Robusta coffee using primer CCRM-14 (a), CCRM-17 (b), CCRM-19 (c), CCRM-33 (d), CCESSR-05 (e), CCESSR-14 (f), CCESSR-22 (g) and CCESSR-41 (h)

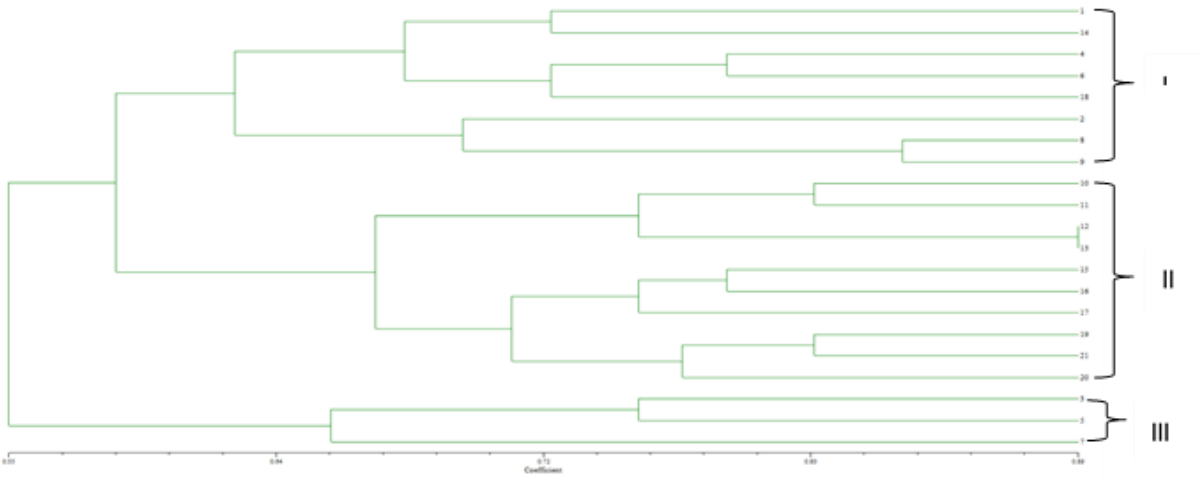


Figure 4 Dendrogram generated using Jaccard's coefficient and UPGMA cluster analysis in 21 Robusta coffee analysed by 8 PCR-based markers

Table 2 Primer and base to study of Traditional Robusta coffee

Primer	Base
CCRM-14F	ATT TGA TTT CTT CTT TCT CTG TTG TC
CCRM-14R	ACA AAA GCC CTG AAA ATA ATA GAT CTA
CCRM-17F	TAA GCG TTG GAA TTC TCT ACT CTA TCT
CCRM-17R	AAG GCA ATG TTG GTC AGC AGT GG
CCRM-19F	GTT TTT TTT TTT CTT TTT TCT TTT TGA GCT
CCRM-19R	AAG GCA ATG TTG GTC AGC AGT GG
CCRM-33F	ACA GCC CGT TGA ACT TAT GGG ATT ACA
CCRM-33F	ACA AAG GGA TGG AGA GGA TGG AAT ATA C
CCESSR-05F	AGG GGC TGG TTA TTT TTT GGG
CCESSR-05R	GGG GGT AAA TAC GGG AAA GCA GA
CCESSR-14F	CTT GCC CCC TTC CCT CCC ACT C
CCESSR-14R	TTC GGC TCC TTG TGT TTG GGT A
CCESSR-22F	CCC TCA ATC TCG TCC CCC TCT
CCESSR-22R	CCC TCC ATA AAT CTT CTT CAC GTA CTC
CCESSR-41F	GGG CTG CAG GCT TGT CAC CAC
CCESSR-41R	ACA AAA GCC CTG AAA ATA ATA GAT CTA

สรุป

จากการสำรวจและรวบรวมกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่ภาคใต้ จำนวน 20 แหล่ง พบว่า ต้นกาแฟมีอายุตั้งแต่ 49-120 ปี สำหรับกาแฟที่มีลักษณะดีตามเกณฑ์การคัดเลือก คือ ข้อถี่ ความยาวข้อไม่เกิน 8 เซนติเมตร จำนวนผลต่อข้อมาก และขนาดผลใหญ่ สามารถคัดเลือกได้ 2 แหล่ง คือ 1) NSK3 (อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา) มีอายุ 102 ปี ลักษณะเด่น คือ มีจำนวนข้อ/กิ่งมาก ความยาวข้อสั้น จำนวนผล/ข้อ และขนาดผลใหญ่ เท่ากับ 11.3 ข้อ/กิ่ง 5.4 เซนติเมตร 16.9 ผล/ข้อ 1.9 และ 2.3 เซนติเมตร ตามลำดับ และ 2) ST3 (อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล) มีอายุ 95 ปี ลักษณะเด่น คือ มีจำนวนข้อ/กิ่งมาก ความยาวข้อสั้น และจำนวนผล/ข้อมาก เท่ากับ 11.3 กิ่ง/ข้อ 6.8 เซนติเมตร และ 29.0 ผล/ข้อ ตามลำดับ ส่วนความสามารถในการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากการเสียบยอดกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ คือ TR1 (อำเภอนาโยง จังหวัดตรัง) เป็นกาแฟที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกาแฟโรบัสตาพันธุ์ดั้งเดิม สามารถจัดกลุ่มตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ใกล้ชิดกับพันธุ์ชุมพร 2 ซึ่งเป็นพันธุ์การค้า คือ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พันธุ์ SSK1 SSK2 SSK3 SSK4 (อ.สะบ้าย้อย จ.สงขลา), ST1 ST2 ST3 (อ.ควนโดน ควนกาหลง จ.สตูล), TR1 (จ.ตรัง) และ YL1 (จ.ยะลา)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

เอกสารอ้างอิง

Aiumsumang, S. and Phimphan, S. 2020. Genetic diversity in coffee (*Coffea arabica*) from Khao Kho District Phetchabun Province by SSR marker technique. Khon Kaen Agriculture Journal 48 (SUPPL1): 515-524.

Chiarawipa, R. and Sirikantayakul, C. 2015. Traditional Robusta Coffee in Satun Province: The values in a community-based conservation. *In* Long Lae (Collected Article in PSU). No.7, pp. 82-85. Songkhla: Research and Development Office, Prince of Songkla University.

Department of Agricultural Extension. 2014. Thai coffee history. *In* Optimizing Coffee Production. pp. 9-10. Bangkok: Agricultural cooperative printing demonstrations of Thai co., Ltd.

Department of Agriculture. 2019. Coffee Strategy 2017–2021. Available from: https://www.doa.go.th. (accessed on 11 January 2020).

Healey, A., Furtado, A., Cooper, T. and Henry, RJ. 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. Plant Methods 10: 21. DOI :10.1186/1746-4811-10-21.

Horticultural Research Institute. 2019. Robusta coffee varieties. *In* Robusta Coffee Production. pp. 2. Bangkok: guarantee.

Office of Agricultural Economics. 2013. Coffee. Available from: https://mis-app.oae.go.th/product/%e0%b8%81%e0%b8%b2%e0%b9%81%e0%b8%9f. (accessed on 11 January 2020).

Prasad, H. and Ramesh, K.A. 2014. Development of genic and genomic SSR markers of Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre Ex A. Froehner). PLoS ONE 2: DOI:10.1371/journal.pone.0113661.

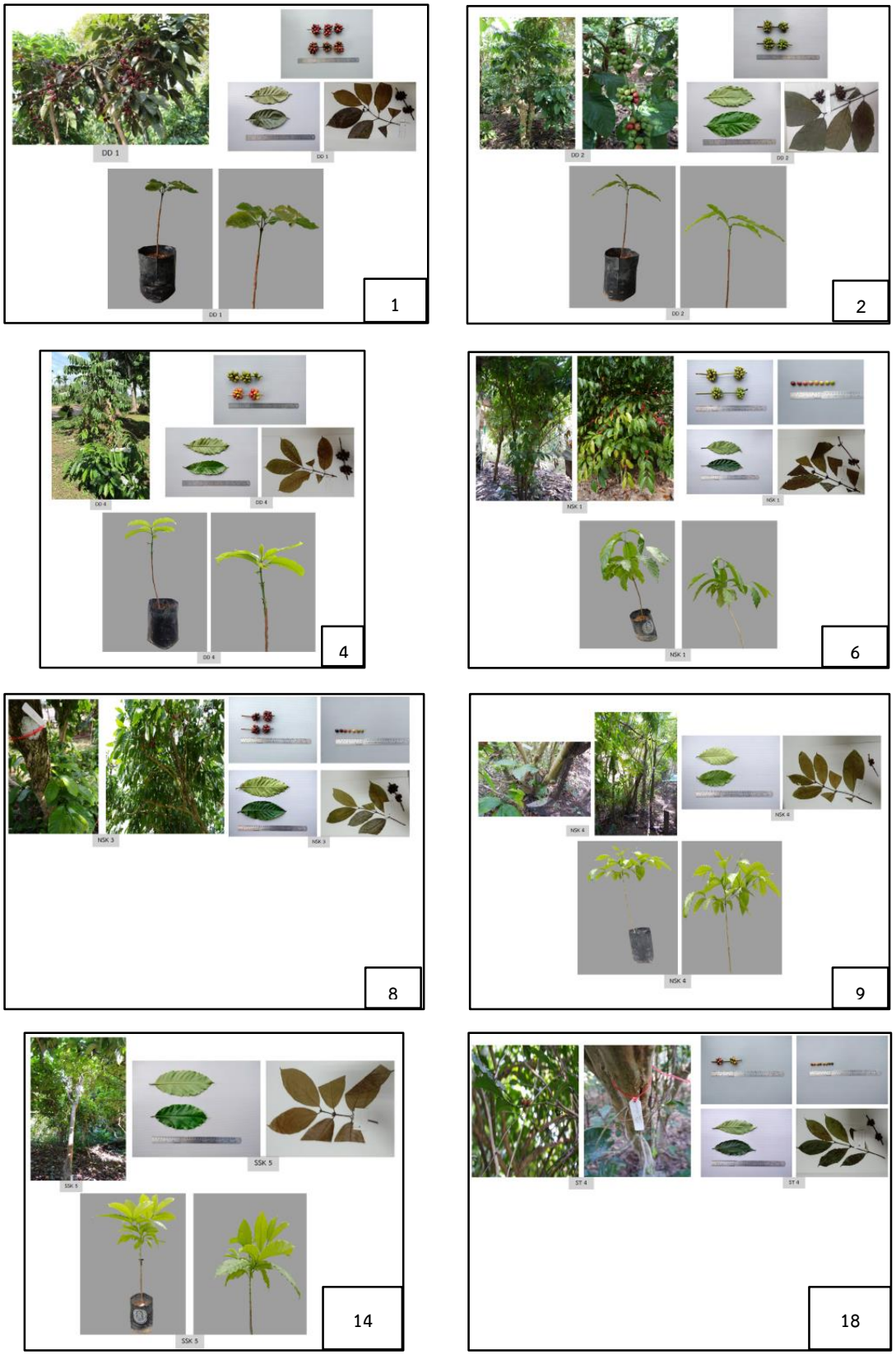
Sriwat, W. 2016. Saba Yoi Coffee, Songkhla Province: Thailand's first Robusta origin. News Southern. Available from: https://www.paaktai.com/news_economy/detail/1674/data.html (accessed on 11 January 2020).

Thavornrat, T. 2005. Coffee Development in Thailand. Available from: http://lib.doa.go.th/multim/e-book/EB00175.pdf. (accessed on 11 January 2020).

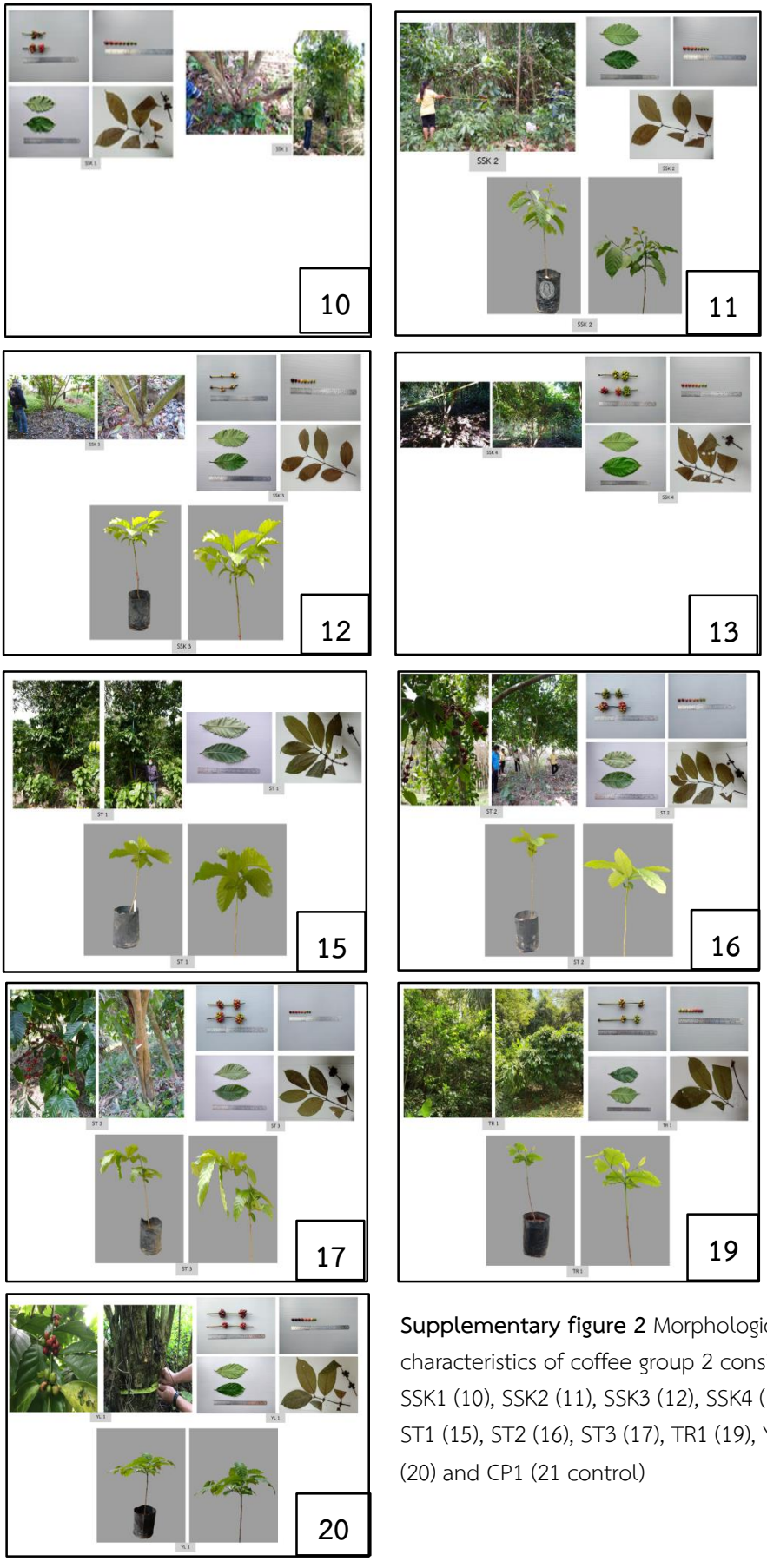
Tummakat, A. and Thanomthin, V. 1986. Robusta coffee history. THAI Agricultural Research Journal 4: 174-177.

SJPS-09-02-M04-O66-01

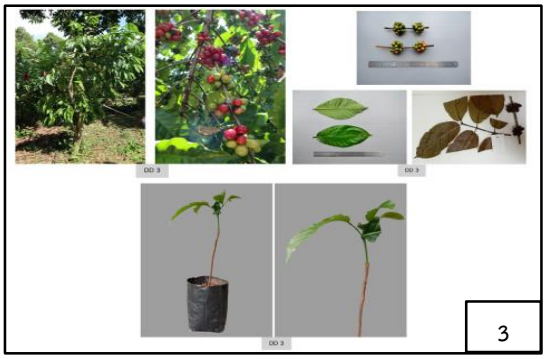
Supplementary figures

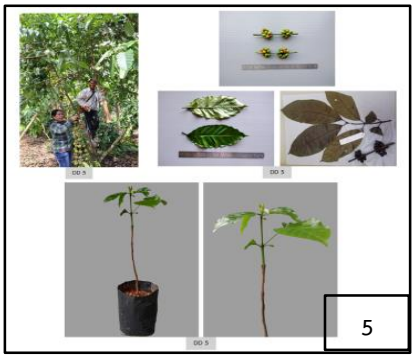


Supplementary figure 1 Morphological characteristics of coffee group 1 consist of: DD1 (1), DD2 (2), DD4 (4), NSK1 (6), NSK3 (8), NSK4 (9), SSK5 (14) and ST4 (18)



Supplementary figure 2 Morphological characteristics of coffee group 2 consist of: SSK1 (10), SSK2 (11), SSK3 (12), SSK4 (13), ST1 (15), ST2 (16), ST3 (17), TR1 (19), YL1 (20) and CP1 (21 control)





Supplementary figure 3 Morphological characteristics of coffee Group 3 consist of: DD3 (3), DD5 (5) and NSK2 (7)