



**KIT - Botanisches Institut**

F2 Praktikum "Plant Evolution"

**Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis  
von *Dianthus* Arten**

Protokoll

Camille Le Gall und Roman Mühlshlegel

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Kontext .....	4
2. Material und Methoden .....	5
2.1 Sammeln der Proben.....	5
2.2 DNA Extraktion .....	6
2.3 DNA Qualität Prüfung mittels Nanodrop .....	6
2.4 Test PCR 10 µL .....	6
2.5 Agarose Gelelektrophorese.....	6
2.6 Barcoding PCR 30µL.....	7
2.7 Sequenzierung.....	7
2.8 Primer Erstellung.....	7
2.9 Diagnostische (ARMS) PCR 10µL .....	7
3. Ergebnisse.....	9
3.1 DNA Extraktion Prüfung: Nanodrop & Test PCR .....	9
3.2 Barcoding PCR .....	9
3.3 Pre-Sequenzierung .....	10
3.4 Diagnostische PCR .....	11
4. Diskussion.....	16
5. Fazit .....	17
6. Literatur .....	18

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Test PCR - rbcL.....	9
Abbildung 2: Barcoding PCR - matK .....	10
Abbildung 3: Barcoding PCR - ITS .....	10
Abbildung 4: Aufreinigung der Marker für die Sequenzierung .....	11
Abbildung 5: Diagnostischer Primer <i>Bambus</i> 432 .....	12
Abbildung 6: Diagnostischer Primer <i>Dianthus</i> 332 .....	13
Abbildung 7: Diagnostischer Primer Cam 407 fw.....	13
Abbildung 8: Diagnostischer Primer Cam 407 rv.....	14
Abbildung 9: Diagnostischer Primer Cym 176.....	14
Abbildung 10: Diagnostische Primer <i>Dianthus</i> 332, <i>Bambus</i> 432, Cam 407 rv .....	15

## 1. Einleitung und Kontext

In den vergangenen Jahren ist die Nachfrage nach verschiedenen Bambusprodukten stark angestiegen. Vor allem Bambustee erfreut sich heute einer stetig wachsenden Beliebtheit. Viele Teehäuser im Internet oder auch Teekontore werben damit, dass der Tee vitaminreich sei, eine natürliche Süße habe, er aufgrund des extremen Wachstums von Bambus nachhaltig sei, er entwässernd wirkt, er die Verdauung und den Stoffwechsel anregt und dass er frei von Koffein oder Teein sei und deshalb für Menschen, die diese Stoffe nicht vertragen, besonders bekömmlich ist. Unabhängig von Gültigkeit der Eigenschaften, die dem Tee in der Werbung zugeschrieben werden, wurde durch Zufall entdeckt, dass sich Spuren von *Dianthus*-Arten in Bambusteeproben befinden.

Die Pflanzengattung *Dianthus* (Nelken) ist Teil der Familie der *Caryophyllaceae* (Nelkengewächse) und ist bei der Onlinedatenbank "The Plant List" mit 338 Arten eingetragen. In der Flora von China sind um die 600 Arten verzeichnet, die in den nördlichen gemäßigten Breiten verbreitet sind. Die verschiedenen Arten sind meist mehrjährige krautige Pflanzen, die in vielen Regionen kultiviert werden. Neben dem ästhetischen Aspekt sind es vor allem die Arten *D. chinensis* und *D. superbus* die auch in der traditionellen chinesischen Medizin verwendet werden. Diese Arten beinhalten eine Vielzahl von chemischen Komponenten. Darunter befinden sich unter anderem Antochanin und verschiedene Typen von Saponinen. Untersuchungen haben gezeigt, dass Auszüge von *D. chinensis* Kontraktionen des Uterus auslösen können. Dieser Effekt ist abhängig von der zugeführten Dosis und variiert in Länge und Intensität. Daher wird von verschiedenen Ratgebern darauf hingewiesen, dass es bei Schwangerschaft nicht eingenommen werden dürfe.

Das Ziel ist es nun ein Verfahren zu entwickeln mit welchem direkt nachgewiesen werden kann, ob sich eine Art der Gattung *Dianthus* in der Probe befindet oder nicht. Proben können dann verschiedene Tees, Teemischungen oder anderes sein. Die Idee dabei ist es einen diagnostischen Primer zu entwickeln, der aufgrund seiner Spezifität an *Dianthus* Arten bindet und dann mittels einer PCR (siehe Abschnitt 2) und anschließender Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2) nachgewiesen werden kann. Zusätzlich können Primer für andere Gattungen entwickelt werden um andere Inhaltsstoffe ebenso nachweisen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Sammeln der Proben

Zum Teil wurden schon bereit getrocknete Proben zur Verfügung benutzt, und zum Teil wurden die restlichen Proben in der botanische Garten gesammelt (frische Proben).

Hier stehen die Akzession Nummer und Nahmen der verschiedenen Arten von *Dianthus*.

Sample	Accession - Id	Taxon	Note
1	8178	<i>D. crinitus</i>	Getrocknete Probe
2	7904	<i>D. chinensis</i>	Getrocknete Probe
3	8365	<i>D. plumarius</i>	Getrocknete Probe
4	7854	<i>D. viscidus</i>	Getrocknete Probe
5	8152	<i>D. armeria</i>	Getrocknete Probe
6	8182	<i>D. squarrosus</i>	Getrocknete Probe
7	8177	<i>D. cibarius</i>	Getrocknete Probe
8	7911	<i>D. imereticus</i>	Getrocknete Probe
9	8180	<i>D. hysso</i>	Getrocknete Probe
10	8514	<i>D. caryophyllus</i>	Getrocknete Probe
11	8181	<i>D. plumarius</i>	Getrocknete Probe
12	7914	<i>D. orientalis</i>	Getrocknete Probe
13	7890	<i>D. sequieri</i>	Getrocknete Probe
14	7917	<i>D. superbus</i>	Frishpflanze
15	7908	<i>D. carthusianorum</i>	Frishpflanze
16	8515	<i>D. caryophyllus</i>	Frishpflanze
17	8238	<i>D. furcatus</i>	Frishpflanze
18	7866	<i>D. tianschanicus</i>	Frishpflanze
19	8237	<i>D. furcatus</i>	Frishpflanze
20	7915	<i>D. orientalis</i>	Frishpflanze

## 2.2 DNA Extraktion

Die DNA Extraktion wurde durch schockgefrieren und zerkleinern des Ausgangsmaterials durchgeführt. Dann wurde die DNA mittels innuPREP Plant DANN Kit (Analytic Jena) isoliert. Um keine lysierte Pflanzenbestandteile zu entfernen, beinhaltet die Prozessur einen Vorfiltrationsschritt. Die DNA wird mittels eines Bindebuffer an eine Säule gebunden, und kann nach dem Waschschrift direkt für die Experimente verwendet werden.

## 2.3 DNA Qualität Prüfung mittels Nanodrop

Die Qualität der isolierten DNA wird zuerst mittels Nanodrop geprüft. Um verschiedene Parameter (Konzentration, A280, A260, ...) zu messen, wird eine 1  $\mu\text{L}$  DNA Probe benutzt.

## 2.4 Test PCR 10 $\mu\text{L}$

Diese PCR zielt darauf ab, die Qualität der isolierten DNA zu prüfen. Der Master Mix enthält die folgenden Bestandteile:

<b>Bestandteil</b>	<b>Quantität (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	6.80
<b>BSA</b>	1.00
<b>Elution Buffer</b>	1.00
<b>dNTPs</b>	0.20
<b>Fw-primer</b>	0.20
<b>Rv-primer</b>	0.20
<b>Polymerase</b>	0.10
<b>DNA Probe</b>	0.5
<b>Total</b>	10

## 2.5 Agarose Gelelektrophorese

Um die verschiedene Ergebnisse zu prüfen, wurden viele Elektrophoresen durchgeführt. Jedes 35 ml Gel enthält 1,5% Agarose und bleibt 25 Minuten in der Maschine. Nach jeder PCR wurden die Proben mit einem Gel geprüft.

## 2.6 Barcoding PCR 30µL

Jede DNA Probe wurde danach mittels zwei verschiedener Primerer in den chloroplastischen Genom (matK und ITS) amplifiziert. Der MasterMix enthält die folgenden Bestandteile:

<b>Bestandteil</b>	<b>Quantität (µL)</b>
<b>ddH2O</b>	20.50
<b>BSA</b>	3.00
<b>Elution Buffer</b>	3.00
<b>dNTPs</b>	0.60
<b>Fw-primer</b>	0.60
<b>Rv-primer</b>	0.60
<b>Polymerase</b>	0.20
<b>DNA Probe</b>	1.5
<b>Total</b>	30

## 2.7 Sequenzierung

Die erfolgreich amplifizierten Proben wurden zur Sequenzierung geschickt. Vorher wurden sie mittels dem Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) vorbereitet.

## 2.8 Primer Erstellung

Durch eine phylogenetische Analyse (MEGA) wurden die verschiedenen Sequenzen mit Bambusblätter Sequenzen und andere Tee Produkte Sequenzen aligniert und verglichen, damit ein spezifisch Primer (3R Primer) erstellt werden kann.

## 2.9 Diagnostische (ARMS) PCR 10µL

Diese PCR zielt darauf ab, Inhaltsstoffe der Tees zu identifizieren. Der MasterMix enthält einen diagnostischen Primeren, der für jeden Teebestandteil spezifisch ist.

<b>Bestandteil</b>	<b>Quantität (µL)</b>
<b>ddH2O</b>	6.60
<b>BSA</b>	1.00
<b>Elution Buffer</b>	1.00

<b>dNTPs</b>	0.20
<b>Fw-primer</b>	0.20
<b>Rv-primer</b>	0.20
<b>Diagnostische Primer</b>	0.20
<b>Polymerase</b>	0.10
<b>DNA Probe</b>	0.5
<b>Total</b>	10



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 DNA Extraktion Prüfung: Nanodrop & Test PCR

Aus dem Pflanzenmaterial haben wir die DNA herausgezogen, und die DNA Probe mit Nanodrop geprüft. Die Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt.

Die Probe deren Ergebnisse nicht genau im Rahmen waren (im Anhang gelb markiert) haben wir amplifiziert mit verschiedenen Primern (Test PCR, Primer: rbcL und ITS) und auf einem Gel laufen lassen, um die Übereinstimmung der DNA zu prüfen. Die Ergebnisse für die PCR mit dem ITS Primer sind gleich.

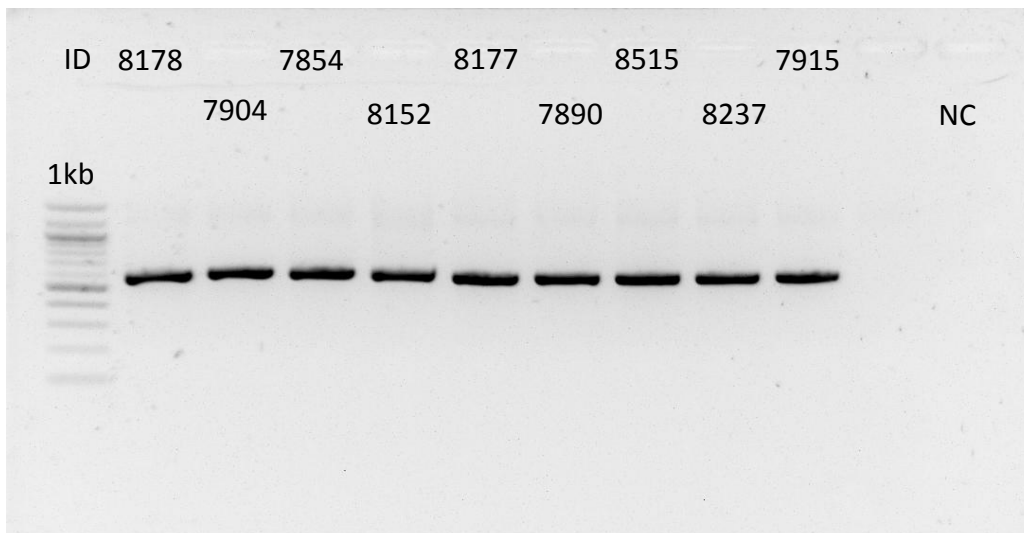


Abbildung 1: Test PCR - rbcL

#### 3.2 Barcoding PCR

Nach der erfolgreichen DNA Extraktion, konnten wir die Barcoding PCR anfangen. Wir benutzten zwei verschiedene Primer: matK und ITS. Dafür benutzten wir alle Proben und führten die PCR in Übereinstimmung mit dem Protokoll durch. Nach der PCR ließen wir die Proben auf einem Gel laufen. Die Ergebnisse können aus der unten stehenden Grafik entnommen werden.

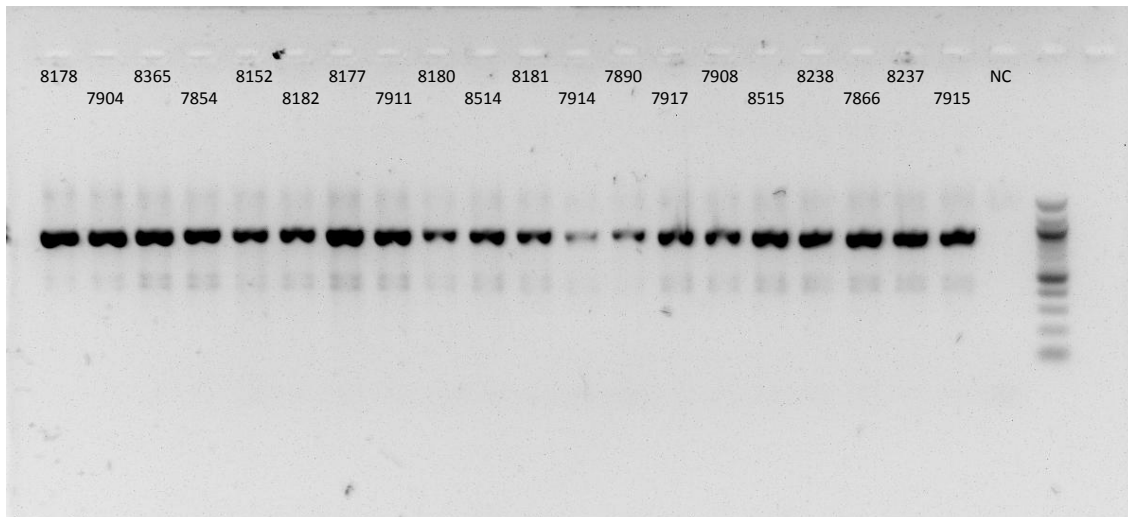


Abbildung 2: Barcoding PCR - matK

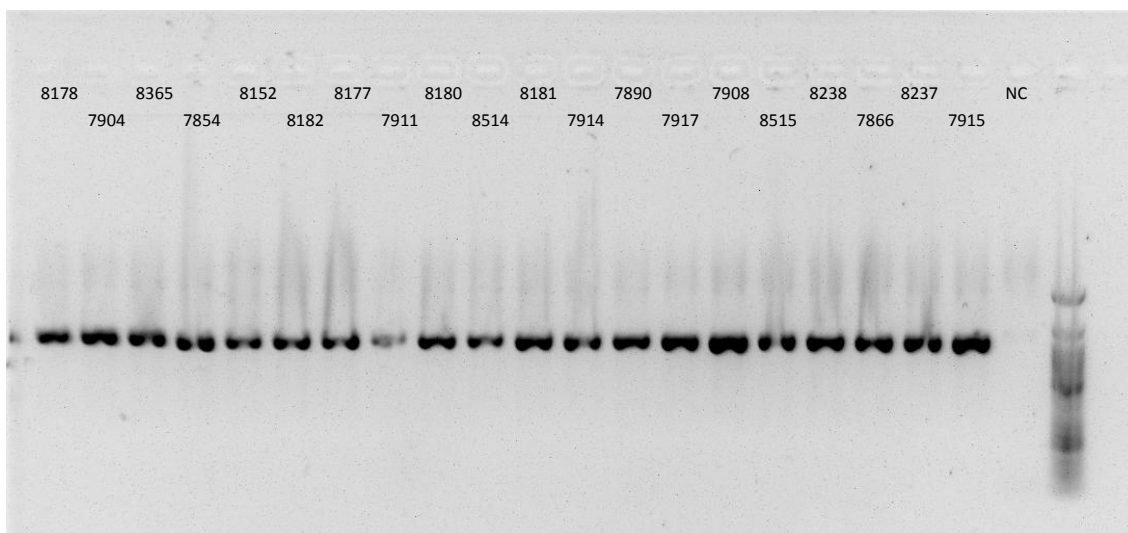


Abbildung 3: Barcoding PCR - ITS

### 3.3 Pre-Sequenzierung

Um die Sequenzierung vorzubereiten, wurde jede PCR Probe (matK und IST) mit Nanodrop geprüft. Die Ergebnisse werden im Anhang dargestellt. Die Proben, deren Ergebnisse nicht genau im Rahmen waren (gelb markiert) wurden nochmals auf einem Gel laufen gelassen.

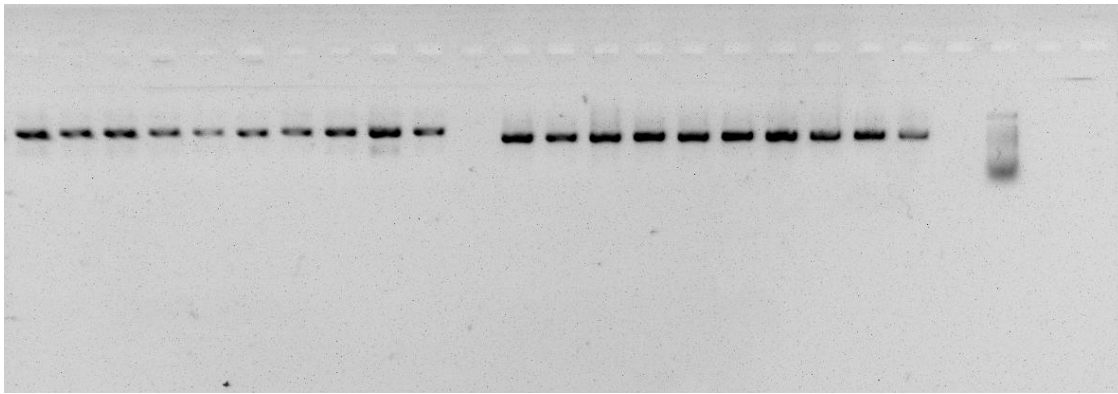


Abbildung 4: Aufreinigung der Marker für die Sequenzierung

Dann wurden die PCR Proben mit der Hilfe des Nucleospin Gel und PCR Clean-up Kit für den Sequenzierung vorbereitet. Da die Ergebnisse für die weitere Verwendung nicht rechtzeitig fertig wurden, wurden aus Zeitgründen schon erhaltenen Sequenzen benutzt, um einen spezifischen Primer zu erstellen.

### 3.4 Diagnostische PCR

Wir haben die folgenden Teeprodukte auf eine D-PCR mit verschiedenen Primern untersucht.

Produkt	Diagnostik	
<b>Name</b>	Morphologie/Histologie	DNA
<b>Karlsruher Liebeszauber</b>	Caryophyllaceae Dianthus, Poaceae Cymbogon „Lemongras“	B1
<b>Bambusgarten Früchtetee</b>	Caryophyllaceae Dianthus	B3
<b>Erdbeer-Bambus Früchtetee</b>	Caryophyllaceae Dianthus	B4
<b>Chinesischer Bambustee</b>	Caryophyllaceae Dianthus	B5
<b>Jade Arrow Zhe Ye Quing</b>	Camelliaceae Camellia sinensis	B6
<b>Wellness Bamboo Tea</b>	Poaceae Bambus	B7
<b>Orangengarten</b>	Poaceae Bambus	B8
<b>Bambus Tee</b>	Poaceae Bambus	BL1

Um die Teeprodukte durch eine Elektrophorese zu prüfen, benutzen wir die folgenden Referenzen.

ID	Morphologie
5597	Bambus (Py)
5722	Cymbogon
7780	Camellia
8319	Bambus (Sasa)
8161	Dianthus
7604	Dianthus

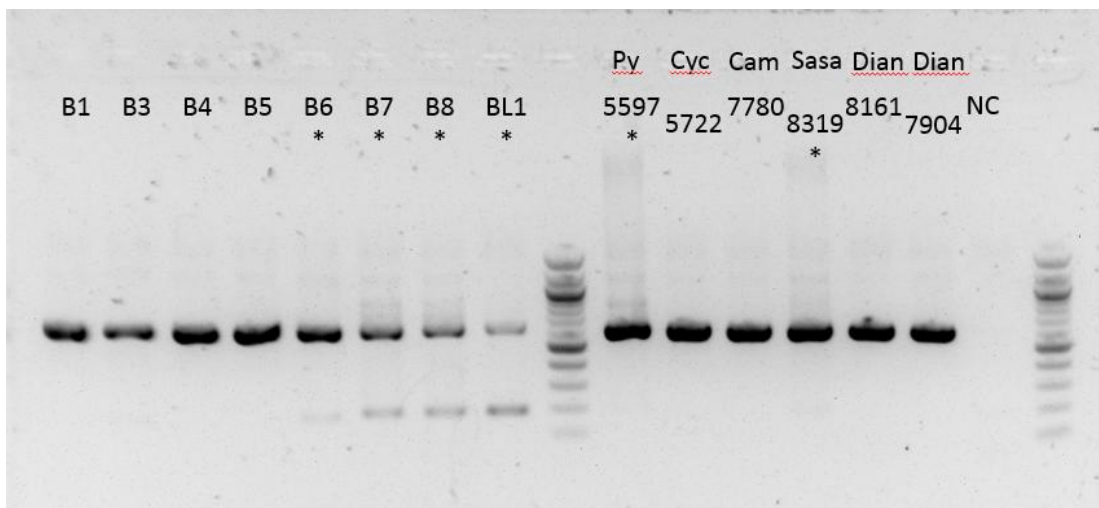


Abbildung 5: Diagnostischer Primer *Bambus* 432

Wir können hier sehen, dass die Produkte, die *Bambus* enthalten, auf dem Gel zwei Banden haben. Die entsprechenden Referenzen (Py & Sasa) haben wahrscheinlich nicht funktioniert. Das B6 Produkt hat außerdem zwei Banden, was nicht zu erwarten war.

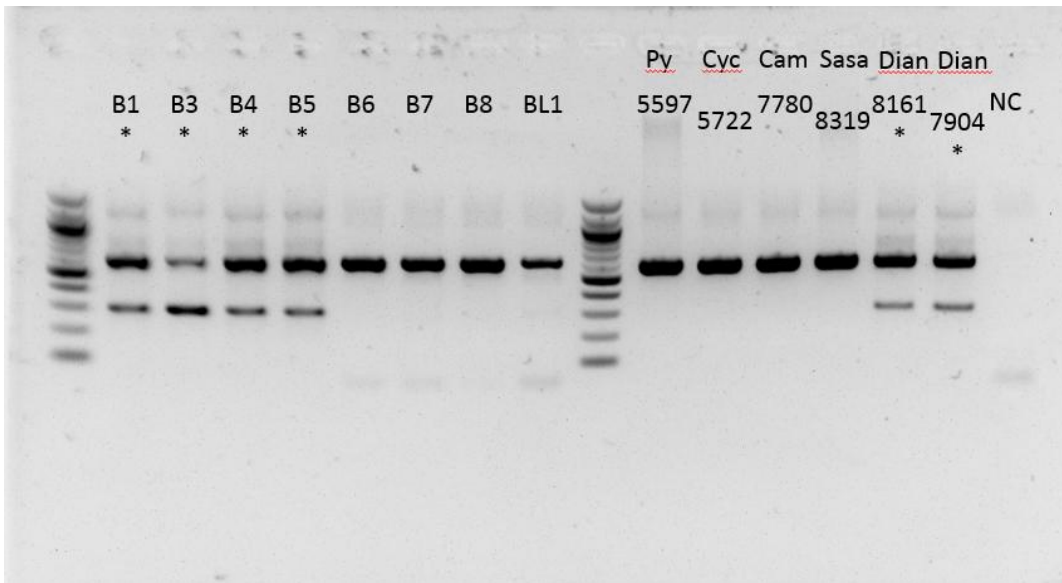


Abbildung 6: Diagnostischer Primer *Dianthus* 332

Wir sehen, dass die Teeprodukte, die *Dianthus* enthalten (B1, B3, B4, B5), eine Doppelbande haben, die der *Dianthus* Referenz entspricht.

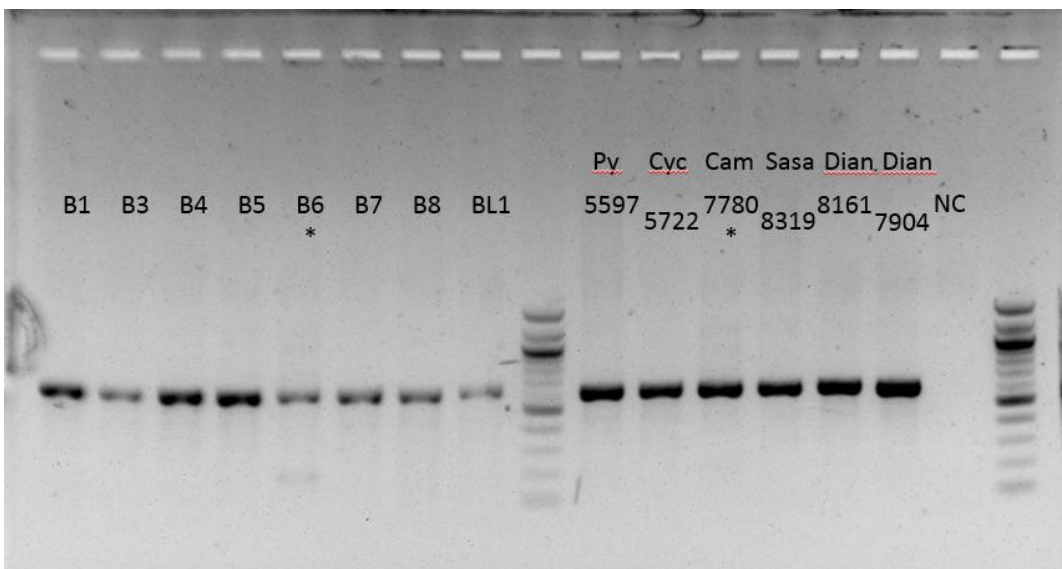


Abbildung 7: Diagnostischer Primer *Cam* 407 fw

In obiger Abbildung lässt sich erkennen, dass das Teeprodukt B6 (das *Camellia* enthält) auf dem Gel zwei Banden hat, obwohl die *Cam* Referenz nicht funktioniert hat.

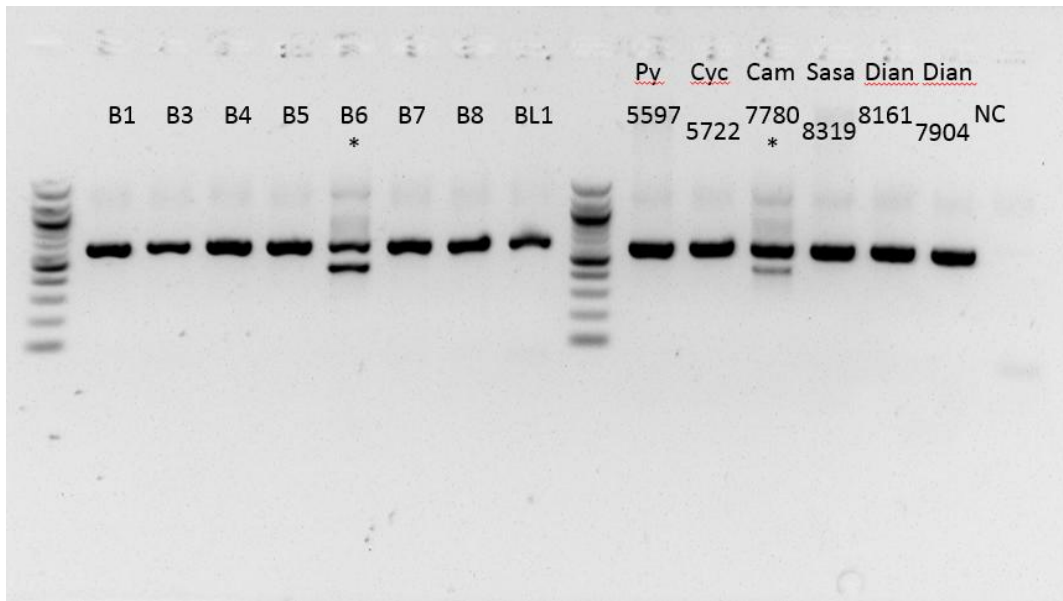


Abbildung 8: Diagnostischer Primer Cam 407 rv

Hier können wir sehen, dass das Teeprodukt B6 (das *Camellia* enthält) zwei Bande hat, die der *Camellia* Referenz entspricht.

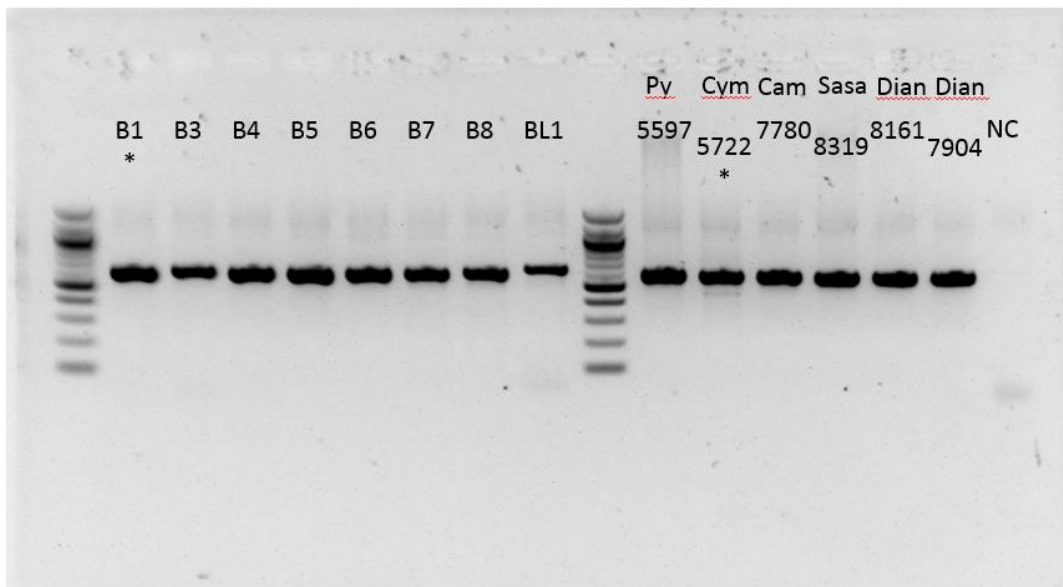


Abbildung 9: Diagnostischer Primer Cym 176

Wir können hier sehen, dass die *Cymbogon* Referenz zwei Bande hat, aber wir können diese Bande für das Produkt B1, das *Cymbogon* enthält, nicht unterscheiden.



Zum Schluss versuchen wir, eine PCR mit allen Primern, die gut funktioniert haben, durchzuführen. Die Ergebnisse lassen sich in unten stehender Abbildung ablesen.

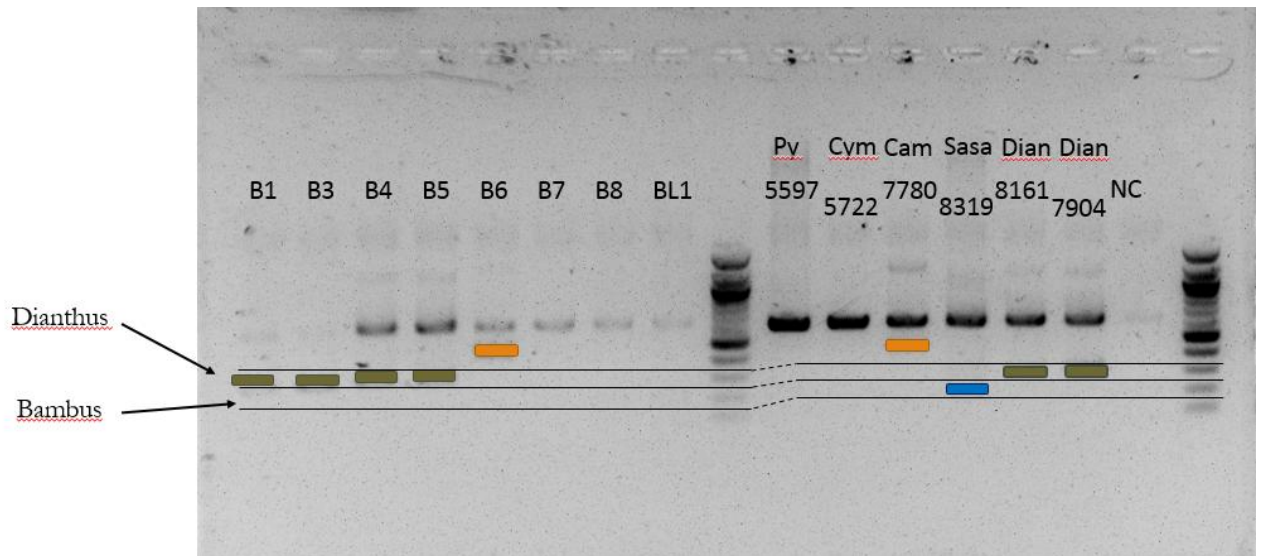


Abbildung 10: Diagnostische Primer Dianthus 332, Bambus 432, Cam 407 rv

## 4. Diskussion

Nach der DNA Extraktion haben wir die Probe mittels Nanodrop geprüft, um zu wissen, ob die verschiedenen gemessenen Parameter im Rahmen waren. Die extreme Ergebnisse (im Anhang Gelb markiert) haben wir nochmal mittels einer PCR geprüft.

Anhand der PCR Ergebnisse könnten wir sagen, dass die DNA Extraktion erfolgreich war, selbst wenn die Konzentrationen unterschiedlich waren. Generell waren frische Proben um ein Vielfaches höher konzentriert.

Deswegen könnten wir die Barcoding PCR führen. Für jeden Primer (MatK & ITS) waren die Banden an der gleichen Höhe. Ausgehend von diesen PCR Ergebnissen könnten wir nach der Prüfung schließen, dass die zwei PCR erfolgreich waren: die amplifizierten Proben könnten zur Sequenzierung geschickt werden. Die Sequenzen haben wir vervollständigt, aligniert und phylogenetisch analysiert, um einen Stammbaum zu erstellen. Dieses Alignment hat uns erlaubt, im Vergleich mit den anderen Teeprodukten, Sequenzen nach spezifischen Positionen zu suchen, um spezifische Primer (je Art von Pflanzen) zu erstellen. Mit solchen Primern konnten wir dann die Diagnostische PCR führen. Wenn der spezifische Primer gut funktioniert hat, haben auf dem Gel die Produkte, die diesen spezifischen Bestandteil enthalten, zwei Banden.

Mit den erstellten Primern, die gut funktioniert haben, haben wir eine Diagnostische PCR durchgeführt, um die verschiedenen Teeinhaltsstoffe zu identifizieren. Diese Kombination hat nur zum Teil funktioniert. *Dianthus* wurde zwar identifiziert, aber es war nicht für die anderen Bestandteile erfolgreich.

Man könnte versuchen, andere Primer zu designen und auszuprobieren, um die Identifikation zu präzisieren und zu verbessern. Eine andere Verbesserungsmöglichkeit würde auf die physische Parameter zu setzen, sodass die Primer besser abgestimmt wären.



## 5. Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode, um Nelken im Bambustee zu identifizieren. Dafür haben wir versucht spezifische Primer zu entwickeln, welche aufgrund ihrer Spezifität, an Nelken (*Dianthus*), *Bambus*, oder auch andere Inhaltsstoffe der Tees binden, und dann mittels PCR und anschließender Elektrophorese nachgewiesen können.

Aus Zeitgründen mussten wir zum Teil schon vorhandene Ergebnisse benutzen, um die Diagnostische PCR durchzuführen. Dies beeinflusst jedoch nicht die Validität der hier vorgestellten Methode und Diagnostik.

Solche Methoden könnte auf andere Probleme und Themen angewendet werden, weil diese sehr präzise und praktisch ist. Dennoch gilt es zu bedenken, dass sich hierbei immer die Frage nach der Finanzierung solcher Forschungsmethoden stellt.

## 6. Literatur

- **Horn, T. (2015):** Skript F2 - Plant Evolution: Gruppe *Dianthus*
- **Horn, T. (2015):** Informationen in seinem Blogg als Ergänzung  
(<http://f2pe.blogspot.de/2015/05/sequenzierung-ergebnisse-der.html>)

[1] <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Caryophyllaceae/Dianthus>

Sample ID	Date	Time	ng/μL	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor pos	Cursor abs	340 raw	Getrockene/Frische
1.8178	16.04.2015	17:42	35,42	0,708	0,453	1,563	0,868	50,00	230	0,816	-0,005	G
2.7904	16.04.2015	17:44	33,16	0,663	0,356	1,862	1,483	50,00	230	0,447	0,172	G
3.8365	16.04.2015	17:47	47,18	0,944	0,565	1,671	0,917	50,00	230	1,029	0,040	G
4.7854	16.04.2015	17:48	64,58	1,292	0,998	1,295	0,462	50,00	230	2,797	0,045	G
4.7854(2)	16.04.2015	17:48	68,18	1,364	0,993	1,374	0,492	50,00	230	2,771	0,054	G
5.8152	16.04.2015	17:49	106,90	2,138	1,098	1,947	1,877	50,00	230	1,139	0,056	G
6.8182	16.04.2015	17:50	64,89	1,298	0,812	1,599	0,801	50,00	230	1,620	0,018	G
7.8177	16.04.2015	17:51	56,80	1,136	0,587	1,935	2,000	50,00	230	0,568	0,017	G
8.7911	16.04.2015	17:51	71,25	1,425	0,759	1,877	1,419	50,00	230	1,004	0,061	G
9.8180	16.04.2015	17:52	63,35	1,267	0,657	1,928	1,842	50,00	230	0,688	0,021	G
10.8514	16.04.2015	17:52	90,02	1,800	0,939	1,917	1,620	50,00	230	1,111	0,062	G
11.8181	16.04.2015	17:53	39,96	0,799	0,418	1,911	1,828	50,00	230	0,437	0,003	G
12.7914	16.04.2015	17:53	32,45	0,649	0,318	2,041	1,803	50,00	230	0,360	-0,123	G
13.7890	16.04.2015	17:54	21,64	0,433	0,236	1,835	1,552	50,00	230	0,279	0,270	F

14.7917	16.04.2015	17:54	200,26	4,005	2,019	1,984	2,196	50,00	230	1,824	0,028	F
16.7908	16.04.2015	17:55	153,17	3,063	1,633	1,876	1,640	50,00	230	1,868	-0,001	F
17.8515	16.04.2015	17:56	165,55	3,311	1,658	1,997	1,964	50,00	230	1,686	0,058	F
18.8238	16.04.2015	17:57	60,21	1,204	0,632	1,905	1,872	50,00	230	0,643	0,017	F
20.7866	16.04.2015	17:57	232,56	4,651	2,268	2,051	2,201	50,00	230	2,113	0,006	F
21.8237	16.04.2015	17:58	159,33	3,187	1,646	1,936	1,661	50,00	230	1,919	-0,140	F
22.7915	16.04.2015	17:58	131,50	2,630	1,357	1,938	2,061	50,00	230	1,276	0,004	F

MatK

preSequenzierung

Sample

ID	Date	Time	ng/μL	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor pos	Cursor abs	340 raw
8178	21.04.2015	14:26	103,85	2,077	1,155	1,798	1,183	50,00	230	1,755	0,149
7904	21.04.2015	14:28	115,24	2,305	1,319	1,748	1,180	50,00	230	1,953	0,155
8365	21.04.2015	14:33	69,49	1,390	0,783	1,775	0,980	50,00	230	1,418	0,071
7854	21.04.2015	14:35	47,02	0,940	0,556	1,691	0,690	50,00	230	1,362	0,133
8152	21.04.2015	14:37	121,08	2,422	1,501	1,614	0,666	50,00	230	3,636	1,351
8182	21.04.2015	14:38	67,16	1,343	0,818	1,642	0,731	50,00	230	1,838	0,474
8177	21.04.2015	14:40	55,71	1,114	0,657	1,696	0,860	50,00	230	1,296	0,392
7911	21.04.2015	14:41	82,63	1,653	1,030	1,605	0,680	50,00	230	2,432	0,782
8180	21.04.2015	14:42	39,34	0,787	0,459	1,715	0,599	50,00	230	1,314	0,231
8514	21.04.2015	14:43	47,8	0,956	0,573	1,668	0,772	50,00	230	1,239	0,364
8181	21.04.2015	14:45	79,59	1,592	0,899	1,771	1,006	50,00	230	1,583	0,190
7914	21.04.2015	14:46	36,5	0,730	0,456	1,601	0,511	50,00	230	1,429	0,268

7890	21.04.2015	14:47	108,11	2,162	1,393	1,552	0,683	50,00	230	3,165	1,374
7917	21.04.2015	14:48	30,88	0,618	0,332	1,861	0,271	50,00	230	2,281	0,015
7908	21.04.2015	14:49	72,28	1,446	0,814	1,776	1,063	50,00	230	1,36	0,098
8515	21.04.2015	14:50	78,05	1,561	0,960	1,626	0,644	50,00	230	2,423	0,944
8238	21.04.2015	14:50	48,49	0,970	0,538	1,803	0,865	50,00	230	1,122	0,049
7866	21.04.2015	14:51	109,87	2,197	1,226	1,792	1,233	50,00	230	1,782	0,190
8737	21.04.2015	14:52	63,93	1,279	0,694	1,843	1,233	50,00	230	1,037	0,100
7915	21.04.2015	14:53	70,66	1,413	0,893	1,582	0,482	50,00	230	2,931	0,698

ITS preSequenzierung

Sample

ID	Date	Time	ng/μL	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor pos	Cursor abs	340 raw
8178	22.04.2015	17:25	97,76	1,955	1,151	1,699	0,723	50,00	230	2,705	0,721
7904	22.04.2015	17:25	63,73	1,275	0,712	1,791	0,879	50,00	230	1,451	0,068
8365	22.04.2015	17:26	68,11	1,362	0,748	1,821	0,830	50,00	230	1,641	0,035
7854	22.04.2015	17:27	47,51	0,95	0,562	1,690	0,504	50,00	230	1,884	0,678
8152	22.04.2015	17:27	54,46	1,089	0,615	1,771	0,732	50,00	230	1,487	0,085
8182	22.04.2015	17:28	83,06	1,661	0,909	1,827	0,970	50,00	230	1,712	0,1
8177	22.04.2015	17:29	52,80	1,056	0,618	1,709	1,122	50,00	230	0,941	0,032
7911	22.04.2015	17:29	54,38	1,088	0,568	1,915	0,959	50,00	230	1,135	0,043
8180	22.04.2015	17:30	65,99	1,32	0,747	1,767	1,071	50,00	230	1,232	0,047
8514	22.04.2015	17:31	47,55	1,951	0,523	3,730	1,965	50,00	230	0,993	0,06
8181	22.04.2015	17:31	81,25	1,625	0,908	1,790	0,675	50,00	230	2,408	0,149

7914	22.04.2015	17:32	70,95	1,419	0,779	1,822	1,109	50,00	230	1,28	0,075
7890	22.04.2015	17:32	54,10	1,082	0,605	1,788	1,055	50,00	230	1,026	0,024
7917	22.04.2015	17:33	104,39	2,088	1,232	1,695	0,905	50,00	230	2,306	0,536
7908	22.04.2015	17:34	98,54	1,971	1,129	1,746	0,786	50,00	230	2,507	0,437
8515	22.04.2015	17:34	62,07	1,241	0,733	1,693	0,781	50,00	230	1,588	0,106
8238	22.04.2015	17:35	70,83	1,417	0,788	1,798	0,709	50,00	230	1,998	0,091
7866	22.04.2015	17:05	73,22	1,464	0,773	1,894	1,408	50,00	230	1,04	0,013
8737	22.04.2015	17:36	92,00	1,84	1,029	1,788	0,982	50,00	230	1,874	0,362
7915	22.04.2015	17:36	70,64	1,413	0,769	1,837	1,148	50,00	230	1,231	0,008