

# Metodologia di sperimentazione in agricoltura

Andrea Onofri

2018-12-10

# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>3</b>
1.1	Organizzazione del corso . . . . .	3
1.2	Esercitazioni pratiche . . . . .	3
	Obiettivi specifici del Corso . . . . .	4
<b>2</b>	<b>Il metodo sperimentale: quando la scienza scienza</b>	<b>5</b>
2.1	Introduzione . . . . .	5
2.1.1	Cosa quindi una prova scientifica? . . . . .	6
2.2	Esperimenti buoni e cattivi! . . . . .	7
2.2.1	L'errore sperimentale . . . . .	7
2.2.2	Il campionamento . . . . .	8
2.3	Scienza = metodo . . . . .	9
2.4	Chi valuta se un esperimento attendibile? . . . . .	11
2.5	Il metodo sperimentale . . . . .	12
2.6	Metodi sperimentali validi ed invalidi . . . . .	12
2.6.1	Primo esperimento . . . . .	13
2.6.2	Secondo esperimento . . . . .	13
2.6.3	Terzo esperimento . . . . .	14
2.6.4	Quarto esperimento: quello buono . . . . .	14
2.7	Incertezza residua . . . . .	14
2.8	Il ruolo della statistica . . . . .	15
2.9	Conclusioni . . . . .	15
<b>3</b>	<b>Introduzione al disegno sperimentale</b>	<b>17</b>
3.1	Definizioni . . . . .	17
3.2	Elementi fondamentali del disegno sperimentale . . . . .	19
3.2.1	Controllo degli errori . . . . .	20
3.2.2	Replicazione . . . . .	24
3.2.3	Randomizzazione . . . . .	25
3.2.4	Esperimenti non validi . . . . .	28

3.3	Progettazione di un esperimento (protocollo) . . . . .	34
3.3.1	Ipotesi scientifica $\rightarrow$ obiettivo dell'esperimento . . . . .	34
3.3.2	Casi di studio - 1 . . . . .	35
3.3.3	Identificazione dei fattori sperimentali . . . . .	36
3.3.4	Esperimenti (multi)fattoriali . . . . .	37
3.3.5	Aggiungere un controllo? . . . . .	37
3.3.6	Fattori sperimentali di trattamento e di blocco . . . . .	37
3.3.7	Casi di studio - 2 . . . . .	38
3.3.8	Identificazione delle unit sperimentali e delle repliche . . . . .	39
3.3.9	Scelta delle variabili da rilevare . . . . .	43
3.3.10	Casi di studio - 3 . . . . .	46
3.3.11	Allocazione dei trattamenti . . . . .	46
3.3.12	Casi di studio - 4 . . . . .	47
3.3.13	Impianto delle prove . . . . .	62
3.4	Come scrivere un progetto di ricerca o un report di ricerca . . . . .	62
3.5	Per approfondimenti . . . . .	63
<b>4</b>	<b>Methods</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>Applications</b>	<b>65</b>
5.1	Example one . . . . .	65
5.2	Example two . . . . .	65
<b>6</b>	<b>Final Words</b>	<b>66</b>
	<b>References</b>	<b>67</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Organizzazione del corso

Questo corso si compone di due parti, che sono trattate in parziale sovrapposizione durante il semestre. Nella prima parte, sono fornite le basi teoriche e gli strumenti pratici per pianificare, organizzare e condurre esperimenti scientifici nel settore agrario.

Nella seconda parte, dopo un'introduzione agli argomenti generali relativi alla biostatistica, ci occupiamo dell'analisi e dell'interpretazione dei dati ottenuti nelle prove scientifiche, nonché della presentazione dei risultati tramite tesi, report e/o pubblicazione scientifica. In questa seconda parte, daremo ampio spazio all'impiego di modelli matematici interpretativi, utilizzati sia con finalità descrittive, sia con finalità predittive.

### 1.2 Esercitazioni pratiche

Questo corso non ha finalità puramente teoriche, ma fondamentalmente pratiche, improntate al 'saper fare'. In sostanza, all'fine del corso, gli studenti dovranno essere in grado di pianificare esperimenti ed analizzarne i risultati. È importante quindi lavorare con alcuni casi studio relativi ad esperimenti molto comuni in ambito agrario, come le prove varietali, le prove di concimazione, le prove di diserbo, i dosaggi biologici e i saggi germinativi.

Per poter risolvere gli esempi proposti, lo studente dovr quindi avvalersi di un opportuno software statistiche. In questo caso, abbiamo due proposte: Excel (molto comune) e R (freeware e molto avanzato). A lezione tratteremo prevalentemente R, ma gli studenti, soprattutto quelli che non seguono le lezioni, potranno anche affidarsi ad Excel. In questa dispensa proporremo soluzioni per entrambi i software.

## Obiettivi specifici del Corso

Come dicevamo, il Corso ha un contenuto prettamente tecnico e gli obiettivi specifici sono fondamentalmente pratici, con una forte attenzione al ‘saper fare’.

Gli studenti dovranno:

1. Rispondere a domande generali sulla metodologia sperimentale e sull’organizzazione degli esperimenti
2. Saper disegnare correttamente l’esperimento proposto (uno), scegliendo adeguatamente il layout sperimentale (disegno, numero di repliche) e disegnando la mappa in modo corretto. Gli esperimenti proposto apparterranno alle seguenti categorie: prove di confronto varietale, prove di confronto tra erbicidi, prove di degradazione dei fitofarmaci, dosaggi biologici con erbicidi, prove di concimazione, prove di epoca di semina;
3. Saper eseguire l’ANOVA per il dataset proposto (uno), scelto tra quelli riportati nell’apposito elenco;
4. Saper adattare il modello opportuno (lineare o nonlineare) ad un dataset assegnato, scelto tra quelli riportati nell’apposito elenco. Saper valutare la bont di adattamento del modello.

Per il punto 3 e il punto 4 gli studenti si dovranno avvalere di un supporto informatico, ad esempio costituito dal software R (citation) o da Excel, con la macro DSAASTAT (per l’ANOVA).

## Capitolo 2

# Il metodo sperimentale: quando la scienza è scienza

### 2.1 Introduzione

In una società caratterizzata dal sovraccarico cognitivo immagino sia giusto chiedersi (e chiedere) che cosa sia la scienza, cosa distingua le informazioni scientifiche da tutto quello che invece non è altro che pura opinione, magari autorevole, ma senza il sigillo dell'oggettività.

Per quanto affascinante possa sembrare l'idea del ricercatore che con un'improvviso colpo di genio elabora una stupefacente teoria, dovrebbe essere chiaro che l'intuizione è solo un possibile punto di partenza, che non necessariamente prelude al progresso scientifico, per quanto geniale ed innovativa possa essere. In generale, almeno in ambito biologico, nessuna teoria acquisisce automaticamente valenza scientifica, ma rimane solo nell'ambito delle opinioni, indipendentemente dal fatto che nasca da un colpo di genio, oppure grazie ad un paziente e meticoloso lavoro di analisi intellettuale, che magari si concretizza in un modello matematico altamente elegante e complesso.

Da un punto di vista puramente intuitivo, è ovvio aspettarsi che una prova scientifica debba uscire dall'ambito delle opinioni legate a divergenze di cultura, percezione e/o credenze individuali, per divenire, al contrario, oggettiva e universalmente valida, distinguendosi quindi da altre verità di natura metafisica, religiosa o pseudoscientifica. Che cosa è che permette alla scienza di divenire tale?

A questo proposito, riporto alcuni aforismi significativi:

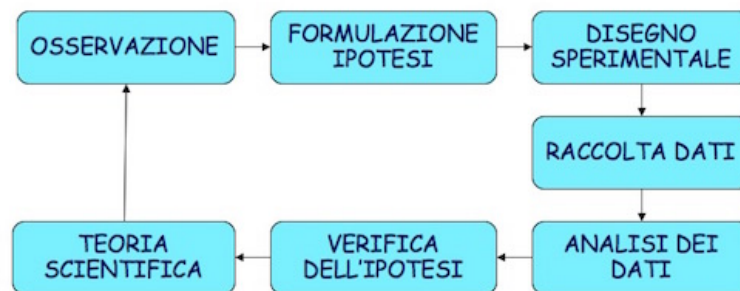


Figura 2.1: Il metodo scientifico Galileiano

1. Proof is a justified true belief (Platone, Dialoghi)
2. The interest I have in believing a thing is not a proof of the existence of that thing (Voltaire)
3. A witty saying proves nothing (Voltaire)

### 2.1.1 Cosa quindi una prova scientifica?

La base di tutta la scienza risiede nel cosiddetto ‘metodo scientifico’, che si fa comunemente risalire a Galileo Galilei (1564-1642) e che è riassunto nella figura seguente.

Senza andare troppo in profondità, è importante notare due aspetti:

1. il ruolo fondamentale dell’esperimento scientifico, che produce dati a supporto di ipotesi pre-esistenti;
2. lo sviluppo di teorie basate sui dati, che rimangono valide fino a che non si raccolgono altri dati che le confutano, facendo nascere nuove ipotesi che possono portare allo sviluppo di nuove teorie, più affidabili o più semplici.

Insomma, l’ingrediente fondamentale di una prova scientifica è supportata da un insieme dei dati sperimentali; di fatto, non esiste scienza senza dati! Resta famoso l’aforisma “In God we trust, all the others bring data”, attribuito all’ingegnere e statistico americano W. Edwards Deming (1893-1993), anche se pare che egli in realtà non l’abbia mai pronunciato.

## 2.2 Esperimenti buoni e cattivi!

Non tutti gli esperimenti sono buoni e, di conseguenza, non tutti i dati sono buoni. In particolare, due sono gli elementi che possono portare a dati di diversa affidabilit :

1. Errore sperimentale
2. Campionamento

Vediamo qualche dettaglio in pi  a proposito di questi due elementi.

### 2.2.1 L'errore sperimentale

Alla base della raccolta di dati sperimentali vi   un processo di **misurazione**, attraverso la quale il fenomeno oggetto di studio viene caratterizzato con appositi strumenti scientifici, pi  o meno complessi. Il problema   che nessuna misura pu  essere considerata precisa in senso assoluto, cio  perfettamente coincidente col valore reale della grandezza misurata, che   destinato a rimanere un'entit  incognita e indeterminabile.

In particolare, in ogni esperimento scientifico esiste un potenziale elemento di confusione che gli scienziati conoscono con il termine di **errore sperimentale**, con la cui presenza   necessario confrontarsi sempre e comunque.

Nel misurare una determinata grandezza fisica, indipendentemente dal metodo scelto per la misura, possiamo sempre commettere due tipi di errore: **sistematico** ed **accidentale (casuale)**.

L'errore sistematico   provocato da difetti intrinseci dello strumento o incapacit  peculiari dell'operatore e tende a ripetersi costantemente in misure successive. Un esempio tipico   quello di una bilancia non tarata, che tende ad aggiungere 20 grammi ad ogni misura che effettuiamo. Per queste sue peculiarit , l'errore sistematico non   quantificabile e deve essere contenuto al minimo livello possibile tramite la perfetta taratura degli strumenti e l'adozione di metodi di misura rigidamente standardizzati e accettati dalla comunit  scientifica mondiale.

L'errore accidentale (o casuale)   invece legato a fattori variabili nel tempo e nello spazio, quali:

1. *malfunzionamenti accidentali dello strumento*. Si pensi ad esempio al rumore elettrico di uno strumento, che fa fluttuare i risultati delle misure effettuate;



2. *imprecisioni o disattenzioni casuali dell'operatore.* Si pensi ad esempio ad un banale errore di lettura dello strumento, che pu capitare soprattutto ad un operatore che esegua moltissime misure manuali con procedure di routine;
3. *irregolarit dell'oggetto da misurare*} unite ad una precisione relativamente elevata dello strumento di misura. Si pensi alla misurazione del diametro di un melone con un calibro: facile che compaiano errori legati all'irregolarit del frutto o al fatto che l'operatore non riesce a misurare lo stesso nel punto in cui il suo diametro massimo. Oppure, pi semplicemente si pensi alla misurazione della produzione di granella di una certa variet di frumento: anche ipotizzando di avere uno strumenti di misura perfetto e quindi esente da errore, la produzione mostrerebbe comunque una fluttuazione naturale da pianta a pianta, in base al patrimonio genetico e, soprattutto, in base alle condizioni di coltivazione che non possono essere standardizzate oltre ad un certo livello (si pensi alla variabilit del terreno agrario).

Dato che queste imprecisioni sono assolutamente casuali chiaro che le fluttuazioni positive (misura maggiore di quella vera) sono altrettanto probabili di quelle negative e tendono a presentarsi con la stessa frequenza quando si ripetano le misure pi volte. Di conseguenza, l'errore sperimentale casuale pu essere gestito attraverso la **replicazione delle misure**: infatti, se ripeto una misura soggetta a questo tipo di errore, nel lungo periodo gli errori positivi e negativi tendono ad annullarsi reciprocamente e la media delle misure effettuate tende quindi a coincidere con il valore reale della grandezza da misurare.

## 2.2.2 Il campionamento

Se vero, e la pratica sperimentale lo conferma, che ripetere le misure porta ad ottenere molti risultati diversi, nasce il problema di capire quante repliche sono necessarie. Se si ripensa a quanto detto finora, dovrebbe risultare evidente che, per ottenere una misura pari all'effettivo (reale) valore della grandezza da misurare, bisognerebbe effettuarne infinite. Tuttavia altrettanto evidente che questo procedimento totalmente improponibile!!!

Qual la strada seguita dagli scienziati, quindi? E' quella di raccogliere un numero finito di misure, sufficientemente basso da essere compatibile con le umane risorse di tempo e denaro, ma sufficientemente alto da essere giudicato attendibile. Qualunque sia questo valore finito, evidente che ci troviamo di fronte solo ad un campione delle infinite misure che avremmo dovuto fare,



Figura 2.2: Conseguenze di un esperimento sbagliato

ma che non abbiamo fatto. La domanda : questo campione rappresentativo o no? E' in grado di descrivere adeguatamente la realtà? E' possibile che gli errori sperimentali positivi e negativi non si siano annullati tra loro, confondendosi con l'effetto biologico in studio? In altre parole: possiamo fidarci dei dati che abbiamo raccolto?

La possibilità di raccogliere dati sbagliati tutt'altro che remota. Gli scienziati americani Pons e Fleischmann il 23 Marzo del 1989 diffusero pubblicamente la notizia di essere riusciti a riprodurre la fusione nucleare fredda, causando elevatissimo interesse nella comunità scientifica. Purtroppo le loro misure erano viziate da una serie di problemi e il loro risultato fu clamorosamente smentito da esperimenti successivi.

## 2.3 Scienza = metodo

Insomma, la scienza deve essere basata sui dati, ma i dati contengono inevitabili fonti di incertezza, legate all'errore sperimentale e al processo di campionamento. Come si può procedere in queste condizioni? Il punto fonda-

mentale quello di adottare un metodo sperimentale che consenta di ottenere dati **il pi affidabili possibile**. Insomma, questa semplice affermazione significa che bisogna fare esperimenti ben condotti, precisi, seguendo procedure standardizzate e/o largamente condivise dalla comunit scientifica.

Certo che, per quanto detto in precedenza, il fatto che i dati provengano da un processo di campionamento impedisce, di fatto, di ottenere un'affidabilit totale. Cosa succederebbe se ripetessimo l'esperimento?

Insomma, bisogna fare alcune considerazioni, che elenco di seguito:

1. in primo luogo si dovr accettare il fatto che, contrariamente a quanto si potrebbe o vorrebbe credere, non esistono prove scientifiche totalmente certe, ma l'incertezza un elemento intrinseco della scienza.
2. In secondo luogo si dovranno utilizzare gli strumenti della statistica necessari per quantificare l'incertezza residua, che dovr essere sempre riportata a corredo dei risultati di ogni esperimento scientifico.
3. Ogni risultato sar quindi valutato dalla comunit scientifica sullo sfondo della sua incertezza, seguendo alcune regole di natura probabilistica che consentono di stabilire se la prova scientifica sufficientemente forte per essere considerata tale.

Un elemento fondamentale di valutazione della bont di un esperimento e dei dati da esso ottenuti sta nella cosiddetta **replicabilit**, cio nella probabilit di ottenere risultati molto simili (se non uguali) replicando l'esperimento in condizioni analoghe. Per valutare se un esperimento replicabile necessario che questo sia descritto con un grado di dettaglio tale da permettere a cinque di ripeterlo, ottenendo risultati comparabili e non contraddittori. Nessun risultato di cui non sia provata la riproducibilit da considerarsi valido.

E' chiaro comunque che ogni esperimento pu essere smentito. Questo non un problema: la scienza pronta a considerare una prova scientifica valida fino a che non si raccolgono dati altrettanto affidabili che la confutino. In questo caso, si abbandona la teoria confutata e si abbraccia la nuova. L'abbandono pu anche non essere totale: ad esempio la teoria gravitazionale di Newton ancora oggi valida per molte situazioni pratiche, anche se stata abbandonata in favore della teoria della relativit, che spiega meglio il moto dei corpi ad altissime velocit.

In effetti, la scienza considera sempre con attenzione il principio del rasoio di Occam, per il quale si accetta sempre la teoria pi semplice per interpretare un dato fenomeno, riservando le teorie pi complesse alle situazioni pi difficili, che giustificano tale livello di complessit.

## 2.4 Chi valuta se un esperimento attendibile?

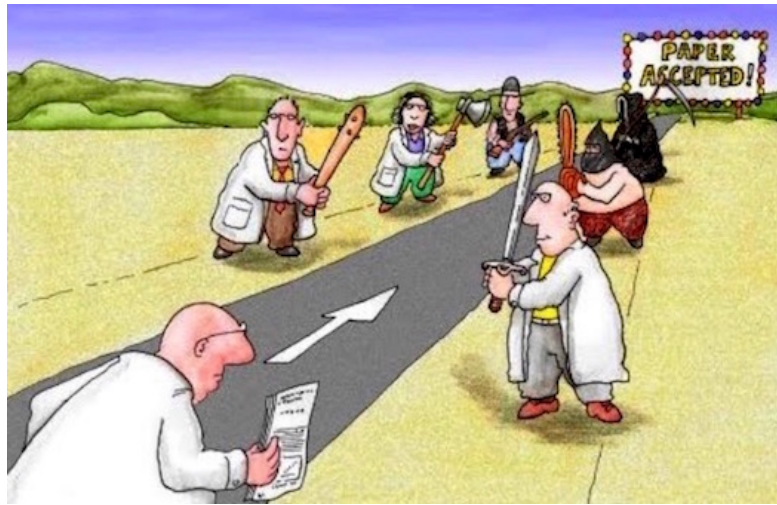
Quanto detto finora vorrebbe chiarire come il punto centrale della scienza non la certezza delle teorie, bensì il metodo che viene utilizzato per definirle. Ognuno di noi quindi responsabile di verificare che le informazioni in suo possesso siano ‘scientificamente’ attendibili, cioè ottenute con un metodo sperimentale adeguato. Il fatto che non sempre siamo in grado di compiere questa verifica, perché non abbiamo strumenti ‘culturali’ adeguati, se non nel ristretto ambito delle nostre competenze professionali. Come fare allora?

L’unica risposta accettabile quella di controllare l’attendibilità delle fonti di informazione. In ambito biologico, le riviste autorevoli sono caratterizzate dal procedimento di ‘*peer review*’, nel quale i manoscritti scientifici, prima della pubblicazione, sono sottoposti ad un comitato editoriale ed assegnati ad un ‘editor’, il quale legge il lavoro e contemporaneamente lo invia a due o tre scienziati anonimi e particolarmente competenti in quello specifico settore scientifico (*reviewers* o revisori).

I revisori, insieme all’*editor*, compiono un attento lavoro di esame e stabiliscono se l’evidenza scientifica presentata sufficientemente ‘forte’. Le eventuali critiche vengono presentate all’autore, che tenuto a rispondere in modo convincente, anche ripetendo gli esperimenti se necessario. Il processo richiede spesso interi mesi ed abbastanza impegnativo per uno scienziato. E’ piuttosto significativa l’immagine presentata in [scienceBlog.com](http://scienceBlog.com), che allego qui.

In sostanza il meccanismo di *peer review* l’analogo scientifico di un processo, nel quale l’inputato (lavoro scientifico) viene assolto (rilasciato, leggi: rigettato) in presenza di qualunque ragionevole dubbio metodologico. Attenzione: il dubbio che non deve esistere quello metodologico, dato che il dubbio sul risultato non può essere allontanato completamente e i reviewer controlleranno solo che esso si trovi al disotto della soglia massima, stabilita con metodiche statistiche.

Questo procedimento, se effettuato con competenza, dovrebbe aiutare a separare la scienza dalla pseudo-scienza e, comunque, ad eliminare la gran parte degli errori metodologici dai lavori scientifici.

Figura 2.3: Il processo di *peer review*

## 2.5 Il metodo sperimentale

Almeno in ambito biologico, la definizione del metodo sperimentale fondamentalmente attribuita allo scienziato inglese Ronald Fisher (1890-1962), che l'ha esplicitata nel suo famoso testo del 1935 (*The design of experiments*). Mi sembra opportuno riassumerla nelle tre espressioni 'chiave': controllo locale degli errori, replicazione e randomizzazione. Si tratta di:

1. contenere al massimo possibile l'errore sperimentale, con l'adozione di tecniche opportune, in modo da separare le fonti di variabilit , isolando quella oggetto di studio (controllo locale degli errori);
2. replicare le misure pi  volte (replicazione)
3. Scegliere le unit  sperimentali da misurare in modo totalmente casuale, cos  da avere un campione rappresentativo ed evitare di confondere gli effetti prodotti dall'errore sperimentale con quelli prodotti dal fenomeno biologico oggetto di studio (randomizzazione)

Vediamo ora un'esempio banale di come procedere.

## 2.6 Metodi sperimentali validi ed invalidi

Immaginiamo un ricercatore che abbia un'idea brillante: egli ha inventato un nuovo fertilizzante 'prodigioso'. E' evidente che non pu  presentarsi alla

comunit scientifica declamando le doti di questo fertilizzante, in quanto egli verrebbe immediatamente esposto al pubblico ludibrio, perch sta presentando delle opinioni, non delle evidenze scientifiche (almeno, cos dovrebbe essere, in una societ sana... purtroppo in un'era di pseudo-scienza siamo sempre pronti a dar credito a chiunque, senza un'adeguata dose di scetticismo... )

### 2.6.1 Primo esperimento

Come ogni scenziato, egli deve raccogliere dati. E lo fa, organizzando un esperimento, nel quale prende un campo di mais e lo fertilizza con il suo nuovo composto, ritraendo una produzione del 20% superiore a quella usuale. Ovvoamente, se prova a pubblicare questa notizia, il suo lavoro verr certamente (si spera...) rigettato, in quanto rimane il dubbio su chi sia la causa dell'effetto riscontrato: il fertilizzante? il clima dell'anno di prova? il suolo? la variet di mais impiegata? E' chiaro che questo non un esperimento controllato: il campo trattato e quello non trattato (riferimento) non sono totalmente uguale, eccetto che per il fertilizzante impiegato.

### 2.6.2 Secondo esperimento

A questo punto il ricercatore pianifica un esperimento comparativo controllato: prende due campio di mais, vicini, con lo stesso terreno, semina la stessa variet di mais e coltiva i due campi esattamente nello stesso modo, con l'unica differenza che in uno di essi somministra il fertilizzante in studio (campo trattato) e nell'altro no (testimone o controllo). Alla fine osserva che il campo trattato produce 130 tonnellate per ettaro, mentre quello non trattato ne produce 115 e conclude che il nuovo fertilizzante efficace (+ 12% circa). Infatti egli ritiene che, dato che i due campi sono totalmente uguali, l'incremento di produzione non possa che essere attribuito al fertilizzante. Scrive un report, che, purtroppo, viene rigettato.

Anche se questo secondo esperimento meglio del primo, permane tuttavia il dubbio che l'effetto si sia prodotto per caso. Potrebbe infatti esserci stata una qualche situazione non osservata che ha avvantaggiato uno dei due campi. Ad esempio un attacco di insetti, una carenza idrica, o qualsivoglia altra situazione. Questo vi sembra improbabile? Non importa, con una sola osservazione il ricercatore non in grado di provare che il risultato replicabile.

### 2.6.3 Terzo esperimento

Avendo imparato la lezione, il ricercatore fa un nuovo esperimento, utilizzando stavolta otto campi: quattro trattati e quattro non trattati. Anche in questo caso osserva un incremento produttivo medio del 12% circa ed è sicuro che l'effetto è replicabile, perché lo ha osservato più volte. Purtroppo, anche questo esperimento non viene considerato affidabile e, di conseguenza, il lavoro non è pubblicabile. Stavolta il problema è che il ricercatore ha scelto i campi trattati con un criterio sistematico (un campo trattato ed uno 'tradizionale' contiguo), cosicché i campi trattati sono tutti a sinistra di quelli 'tradizionali'. Ci crea un ragionevole dubbio: e se vi fosse un gradiente di fertilità da destra verso sinistra? Questo potrebbe dare origine ad una produttività maggiore dei campi a destra, rispetto a quelli a sinistra. In presenza di questo 'ragionevole' dubbio, la prova non può avere valenza scientifica.

### 2.6.4 Quarto esperimento: quello buono

Il ricercatore prende allora otto campi ed assegna il trattamento a quattro di essi, scelti in modo totalmente casuale. In questo caso è sicuro che, anche se vi fosse un qualche elemento estraneo di confusione (gradiente di fertilità, attacco di insetti...), esso dovrebbe colpire le unità sperimentali casualmente disposte senza creare vantaggi particolari all'uno o all'altro dei due trattamenti. Ovviamente egli non è certo (e non può esserlo) che l'esperimento sia del tutto attendibile; infatti potrebbe essere stato così sfortunato che un qualche elemento estraneo ignoto si accanito proprio sulle parcelle non trattate, danneggiandone la produttività. Solo che, grazie alla scelta casuale, questa evenienza diviene altamente improbabile, così da rendere i dubbi irragionevoli. In questo caso l'esperimento controllato, replicato e randomizzato e il risultato ottenuto, in quanto ragionevolmente attendibile, può essere pubblicato.

## 2.7 Incertezza residua

Insomma, un esperimento valido controllato, replicato e randomizzato. Tuttavia le misure raccolte sono poche e sono solo un campione di tutte quelle possibili. Infatti il nostro ricercatore ha usato otto campi, ma ne avrebbe potuti usare 16, 32 e così via. Rimane quindi il dubbio, che, se facessimo

altre misure (cio ampliassimo il campione), queste potrebbero invalidare i risultati ottenuti fino a quel momento.

Se mi concesso un paragone calcistico, un po' come chiedersi come finir una partita di calcio dopo aver assistito solo al primo tempo: in alcune circostanze, quando una delle due squadre ha mostrato una chiara superiorit , la previsione   abbastanza facile, mentre in altre circostanze l'equivalenza dei valori in campo la rende alquanto difficile. In tutti i casi, si tratta solo di una previsione, che pu essere sempre smentita alla prova dei fatti.

Anche la scienza funziona cos. Noi osserviamo solo il primo tempo, che, nel caso del nostro ricercatore, consiste di otto misure. Osserviamo che le quattro misure del fertilizzato sono tutte in modo consistente molto pi alte di quelle del non trattato e quindi possiamo concludere, con ragionevole certezza, che il fertilizzante   efficace. Altrimenti, se la produzione media del trattato   solo lievemente pi alta, il nostro esperimento potr essere inconclusivo, cio incapace di fugare i dubbi sull'effettiva efficacia del nostro fertilizzante. Avremo bisogno di fare altre prove di conferma.

## 2.8 Il ruolo della statistica

Abbiamo visto che un esperimento scientifico, anche se ben fatto (controllato, replicato e randomizzato), pu portare a evidenze scientifiche pi o meno forti. In quest'ottica, la statistica ci fornisce gli strumenti per riassumere le misure effettuate, calcolarne l'incertezza e rappresentare la forza dell'evidenza scientifica, in modo da poter prendere decisioni sull'efficacia dei trattamenti e sull'esigenza di ulteriori verifiche. Imparare a conoscere e comprendere questi strumenti statistici   l'obiettivo di questo corso.

## 2.9 Conclusioni

In conclusione, possiamo ripartire dalla domanda iniziale: "Che cosa   la scienza?", per rispondere che   scienza tutto ci che   supportato da dati che abbiano passato il vaglio della *peer review*, dimostrando di essere stati ottenuti con un procedimento sperimentale privo di vizi metodologici e di essere sufficientemente affidabili in confronto alle fonti di incertezza cui sono associati.



## CAPITOLO 2. IL METODO SPERIMENTALE: QUANDO LA SCIENZA SCIENZA16

Qual il *take-home message* di questo articolo? Fidatevi solo delle riviste scientifiche attendibili, cio quelle che adottano un serio processo di *peer review* prima della pubblicazione.

## Capitolo 3

# Introduzione al disegno sperimentale

### 3.1 Definizioni

La ricerca scientifica trova la sua unit elementare nell'esperimento, cio un *processo investigativo, con il quale, seguendo un adeguato protocollo, si osserva e si misura la risposta prodotta da uno o pi fattori sperimentali nei soggetti coinvolti nello studio*. Raramente gli esperimenti sono isolati, pi spesso fanno parte di uno sforzo collettivo organizzato, generalmente identificato come progetto di ricerca.

Ogni esperimento deve essere attentamente pianificato. Infatti, sappiamo che la variabilit esistente tra soggetti sperimentali, il campionamento, le irregolarit di misura e molti altri fattori perturbativi ci impediscono di osservare la realt con assoluta precisione. E' come se osservassimo un fenomeno attraverso una sorta di lente deformante, che ci impone di adottare un metodo sperimentale rigoroso, per evitare di attribuire al fenomeno in studio effetti che sono invece puramente casuali.

In particolare, gli esperimenti debbono essere:

1. Precisi
2. Accurati
3. Replicabili/Riproducibili

In mancanza di questi requisiti, al termine dell'esperimento possono rimanere dubbi sui risultati, tali da inficiare la validit delle conclusioni raggiunte.

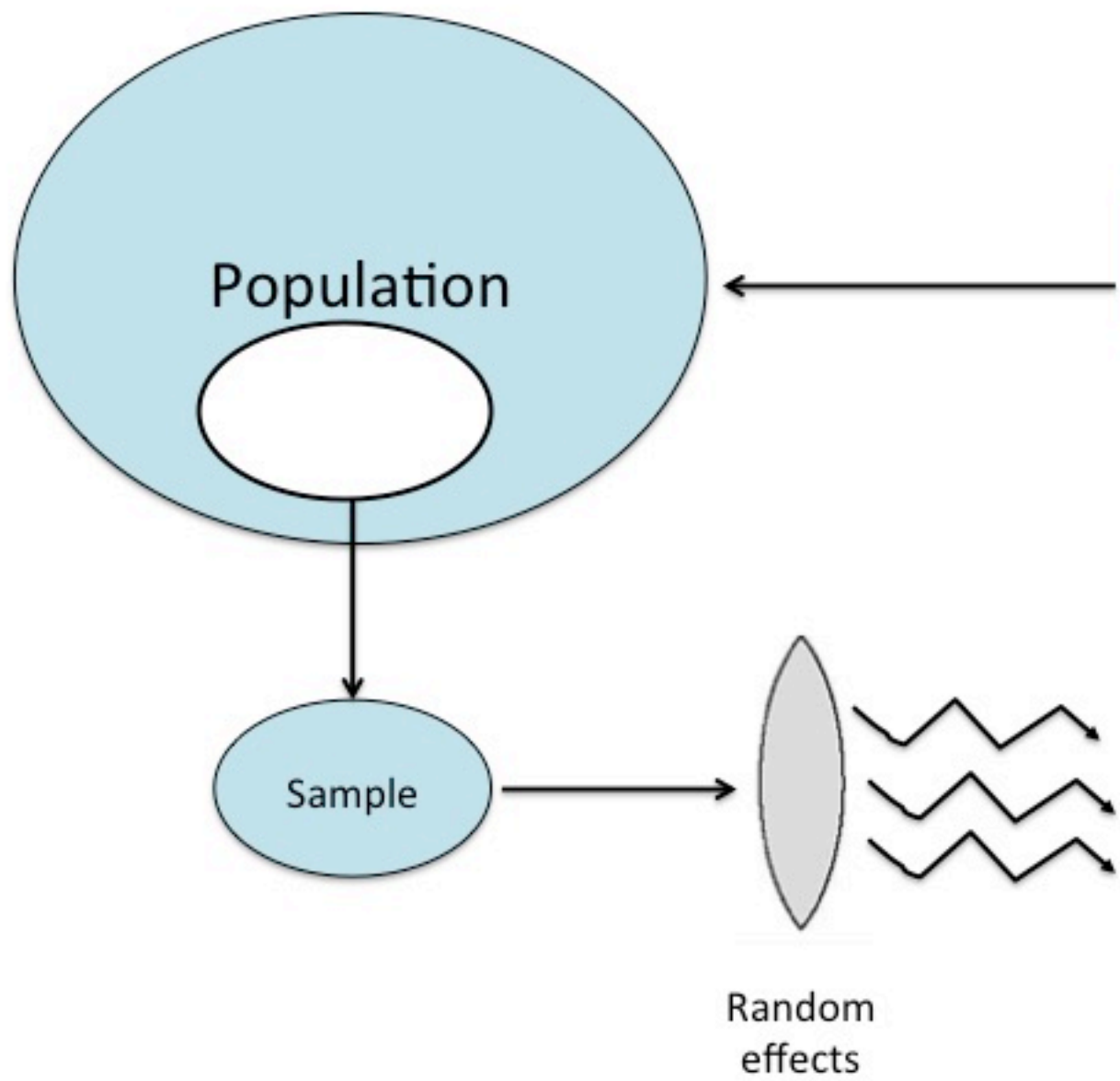


Figura 3.1: Schematizzazione del processo sperimentale

Forse vale la pena di chiarire cosa si intende con precisione, accuratezza e replicabilit/riproducibilit. Abbiamo gi visto che la presenza dell'errore sperimentale ci impone di ripetere le misure pi volte. La precisione di un esperimento non altro che la variabilit dei risultati tra una replica e l'altra.

La precisione, da sola, non garantisce che l'esperimento sia affidabile. Abbiamo menzionato nel capitolo precedente che l'errore sperimentale pu essere casuale o sistematico. Quest'ultimo pu essere dovuto, per esempio, ad uno strumento non accurato che sovrastima tutte le misure. In questo caso, posso ripetere cento volte la misura, ottenendo sempre lo stesso risultato, molto preciso, ma totalmente inaffidabile, nel senso che non riflette la misura reale del soggetto. E' questa l'accuratezza, cio la capacit di una misura (o di un esperimento) di restituire il valore reale, anche se dopo come media di numero molto elevato di replicazioni.

L'accuratezza molto pi importante della precisione: infatti una misura accurata, anche se imprecisa, riflette bene la realt, anche se in modo vago. Al contrario, una misura precisa ma inaccurata ci porta completamente fuori strada, perch non riflette la realt! Un esperimento/risultato non accurato si dice 'distorto' (*biased*).

Oltre a precisione ed accuratezza, siamo anche interessati alla replicabilit di un esperimento, cio alla possibilit che questo, se ripetuto in condizioni assolutamente analoghe (stessi soggetti, ambiente, strumenti...) restituisca risultati equivalenti. Alcuni biostatistici distinguono la replicabilit dalla riproducibilit, in quanto considerano quest'ultima come la possibilit di ottenere risultati equivalenti ripetendo una misura in condizioni diverse (diversi soggetti, diverso ambiente...). E' evidente che un esperimento pu essere totalmente accurato e replicabile, ma non riproducibile con soggetti e condizioni ambientali diverse. Se cos, le conclusioni raggiunte, anche se accurate, non possono essere generalizzate.

## 3.2 Elementi fondamentali del disegno sperimentale

La metodica di organizzazione di un esperimento prende il nome di *disegno sperimentale* e deve essere sempre adeguatamente formalizzata tramite la redazione di un *protocollo sperimentale* sufficientemente dettagliato

da consentire a chiunque la replicazione dell'esperimento e la verifica dei risultati.

Le basi del disegno sperimentale si fanno in genere risalire a Sir Ronald A. Fisher, vissuto in Inghilterra dal 7 Febbraio 1890 al 29 luglio 1962. Laureatosi nel 1912, lavora come statistico per il comune di Londra, fino a quando diviene socio della prestigiosa Eugenics Education Society di Cambridge, fondata nel 1909 da Francis Galton, cugino di Charles Darwin. Dopo la fine della guerra, Karl Pearson gli propone un lavoro presso il rinomato Galton Laboratory, ma egli non accetta a causa della profonda rivalità esistente tra lui e Pearson stesso. Nel 1919 viene assunto presso la Rothamsted Experimental Station, dove si occupa dell'elaborazione dei dati sperimentali e, nel corso dei successivi 7 anni, definisce le basi del disegno sperimentale ed elabora la sua teoria della "analysis of variance". Il suo libro più importante "The design of experiment", del 1935. E' sua la definizione delle tre componenti fondamentali del disegno sperimentale:

1. controllo degli errori;
2. replicazione;
3. randomizzazione.

### 3.2.1 Controllo degli errori

Controllare gli errori, o, analogamente, eseguire un esperimento controllato significa fondamentalmente due cose:

1. adottare provvedimenti idonei ad evitare le fonti di errore, mantenendole al livello più basso possibile (alta precisione);
2. agire in modo da isolare l'effetto in studio (accuratezza), evitando che si confonda con effetti casuali e di altra natura.

Declinare questi principi richiederebbe una vita di esperienza! Vogliamo solo ricordare alcuni aspetti fondamentali.

#### Campionamento corretto

E' evidente che il primo requisito di un esperimento è una corretta scelta delle unit sperimentali, cioè le più piccole unit che ricevono lo 'stimolo' rappresentato dal trattamento, in modo indipendente da tutte le altre.

E' bene subito comprendere una fondamentale distinzione tra unit sperimentali e unit osservative. Le prime sono appena state definite; le seconde sono



Figura 3.2: Una prova sperimentale in campo (Foto D. Alberati)

quelle che costituiscono l'oggetto della misura e possono anche non coincidere con le prime. Ad esempio: immaginiamo di trattare con un diserbante due vasetti, in modo indipendente l'uno dall'altro. Immaginiamo poi di pesare singolarmente le quattro piante di ciascun vasetto; in questa situazione, il vasetto è l'unit sperimentale, le piante sono invece le unit osservazionali. L'elemento discriminante di questo esempio è l'indipendenza: mentre le unit sperimentali hanno ricevuto il trattamento in modo indipendente l'una dall'altra, le unit osservazionali no. Questa differenza fondamentale, per motivi che vedremo più avanti.

Le unit sperimentali possono essere di varia natura; nel caso degli esperimenti di campo, le unit sperimentali sono dette **parcelle** e sono un pezzetto di terreno, di varia forma e dimensione.

Le unit sperimentali sono scelte per campionamento, che è un elemento fondamentale dell'esperimento. Infatti, il censimento, che riguarda tutti i soggetti di un certo ambito, non è, in sé, un esperimento. Ovviamente, il campione deve essere rappresentativo, altrimenti l'esperimento è invalido.

Non è possibile dare indicazioni specifiche di campionamento, perché queste dipendono dalla tipologia di esperimento. Illustriamo quindi solo alcuni criteri generali.

Prima di campionare, dobbiamo avere una chiara visione della cornice di campionamento, cioè della popolazione da cui io devo campionare. Devo ef-

fettuare un esperimento valido per l'Italia centrale, per una localit particolare, per tutta Italia. Devo fare un esperimento che riguarda una stalla in particolare o tutte le stalle dove si allevano bovini? Di quale razza? E' un passaggio fondamentale, in quanto poi le conclusioni non possono che riferirsi alla cornice della popolazione da cui il campione stato estratto, non altre. Per esperimenti nell'ambito delle scienze sociali, diviene fondamentale che la cornice di campionamento abbia le seguenti caratteristiche:

1. le unit sono tutte identificabili e reperibili
2. le unit sono tutte caratterizzate (es. Id)
3. aggiornata e organizzata logicamente
4. non mancano soggetti (che potrebbero quindi sfuggire al campionamento)
5. non ci sono soggetti duplicati
6. non ci sono elementi estranei

Una volta che la popolazione nota ed organizzata, dobbiamo trovare un criterio di selezione. Fondamentalmente ci sono tre possibilit:

1. campionamento randomizzato (casuale)
2. campionamento stratificato
3. campionamento sistematico

Il campionamento randomizzato tale che ogni soggetto ha la stessa possibilit di ogni altro di essere incluso nel campione. Tipicamente, questo campionamento basato su un generatore di numeri casuali, con distribuzione uniforme delle frequenze. Il codice sottostante serve per ottenere cinque elementi casuali da un lotto di 48 identificati con numeri progressivi.

```
sample(1:48, 4)
```

```
## [1] 16 47 41 38
```

Il campionamento casuale pu non dare garanzie sufficienti di rappresentativit. Per questo motivo, a volte, si utilizza il **campionamento stratificato**, con il quale si divide la cornice di campionamento in gruppi omogenei e si prelevano un certo numero di soggetti da ogni gruppo. In questo caso bene ricordare che potrebbe essere auspicabile mantenere nel campione la stessa relazione tra gruppi che esiste nella popolazione. Ad esempio, se in una popolazione di insetti c' il 10% di maschi e il 90% di femmine, io devo prelevare  $n$  maschi e  $m$  femmine, tale che  $n/m = 0.1$ , altrimenti il campione che ottengo potrebbe non essere rappresentativo.

A volte, il campionamento pu essere sistematico, nel senso che utilizzo un criterio non casuale, ma in grado di assicurare una certa rappresentativit. Ad esempio, per campionare gli edifici di una via, potrei decidere di prendere il primo a caso e poi procedere prendendone uno si e tre no. Questo campionamento molto veloce e di facile esecuzione, ma pu dare origine a distorsioni.

Una forma di campionamento quella a cluster: in questo caso suddivido gli elementi in gruppi, scelgo a caso un certo numero di gruppi e poi prendo tutti gli elementi di un gruppo. Ad esempio, devo selezionare i bambini delle scuole elementari del comune di Perugia. In questo caso, invece che selezionare i bambini, posso pi velocemente selezionare le scuole e prendere tutti i bambini delle scuole selezionate. Evidentemente il metodo si basa sull'ipotesi che la selezione rappresentativa delle scuole crea anche una selezione rappresentativa di bambini.

A volte si esegue anche un campionamento a quota, cio si prendono tutti i soggetti che si incontrano in una certa situazione, fino a che non se ne raccolgono un numero prefissato, per alcune classi specificate (Es. 30 donne, 25 uomini, 15 adolescenti e 20 bambini). Questo tipo di campionamento talvolta utilizzato negli esperimenti medici.

## Rigore

Direi che questo aspetto ovvio e non richiede commenti particolari: una ricerca deve essere condotta 'a regola d'arte'. E' evidente che, ad esempio, se vogliamo sapere la cinetica di degradazione di un erbicida a 20 C dovremo realizzare una prova esattamente a quella temperatura, con un erbicida uniformemente distribuito nel terreno, dentro una camera climatica capace di un controllo perfetto della temperatura. Gli strumenti dovranno essere ben tarati e sar necessario attenersi scrupolosamente a metodi validati e largamente condivisi.

Tuttavia, a proporsito di rigore, non bisogna scordare quanto diceva C.F. Gauss a proposito della precisione nei calcoli, e che pu essere anche riferito al rigore nella ricerca : *“Manca di mentalit matematica tanto chi non sa riconoscere rapidamente ci che evidente, quanto chi si attarda nei calcoli con una precisione superiore alla necessit”*



### Omogeneità

Anche in questo caso, l'importanza di scegliere soggetti uniformi e posti in un ambiente uniforme (nello spazio e nel tempo) è evidente. Bisogna comunque tener presente che i risultati di un esperimento si estendono alla popolazione da cui il campione è estratto e della quale esso rappresenta le caratteristiche. Esperimenti nei quali si restringe il campo di variabilità dei soggetti e dell'ambiente sono certamente più precisi, ma forniscono anche risultati meno generalizzabili. L'importante è avere ben chiaro su quale il campo di validità che si vuole dare ai risultati. Ad esempio, se si vuole ottenere un risultato riferito alla collina umbra, bisognerà scegliere soggetti che rappresentano bene la variabilità pedo-climatica della collina Umbra; non più, non meno.

### Evitare le 'intrusioni demoniache'

Secondo Hurlbert (1984), le intrusioni sono eventi totalmente casuali che impattano negativamente con un esperimento in corso. È evidente che, ad esempio, un'alluvione, l'attacco di insetti o patogeni, la carenza idrica hanno una pesante ricaduta sulla precisione di un esperimento e sulla sua riuscita. Nello stesso lavoro, Hurlbert usa il termine 'intrusione demoniaca' per indicare quelle intrusioni che, pur casuali, avrebbero potuto essere previste con un disegno più accurato, sottolineando in questo caso la responsabilità dello sperimentatore.

Un esempio di questo: uno sperimentatore vuole studiare l'entità della predazione dovuta alle volpi e quindi usa campi senza steccionate (dove le volpi possono entrare) e campi protetti da steccionate (e quindi liberi da volpi). Se le steccionate, essendo utilizzate dai falchi come punto d'appoggio, finiscono per incrementare l'attività predatoria di questi ultimi, si viene a creare un'intrusione demoniaca, che rende l'esperimento distorto. Il demone, in questo caso, non è il falco, che danneggia l'esperimento, ma il ricercatore stesso, che non ha saputo prevedere una possibile intrusione.

## 3.2.2 Replicazione

In ogni esperimento, i trattamenti dovrebbero essere replicati su 2 o più unità sperimentali. Ci permette di:

1. dimostrare che i risultati sono replicabili (ma non è detto che siano riproducibili!)

2. assicurare che eventuali circostanze aberranti casuali non abbiano provocati risultati distorti
3. misurare l'errore sperimentale, come variabilit  di risposta tra repliche trattate nello stesso modo (precisione dell'esperimento)
4. incrementare la precisione dell'esperimento (pi  sono le repliche pi  l'esperimento   preciso, perch  si migliora la stima della caratteristica misurata, diminuendo l'incertezza)

Per poter essere utili, le repliche debbono essere indipendenti, cio  debbono **aver subito tutte le manipolazioni necessarie per l'allocazione del trattamento in modo totalmente indipendente l'una dall'altra**. Le manipolazioni comprendono tutte le pratiche necessarie, come ad esempio la preparazione delle soluzioni, la diluizione dei prodotti, ecc..

La manipolazione indipendente fondamentale, perch  in ogni parte del processo di trattamento possono nascondersi errori pi  o meno grandi, che possono essere riconosciuti solo se colpiscono in modo casuale le unit  sperimentali. Se la manipolazione , anche solo in parte, comune, questi errori colpiscono tutte le repliche allo stesso modo, diventano sistematici e quindi non pi  riconoscibili. Di conseguenza, si inficia l'accuratezza dell'esperimento. Quando le repliche non sono indipendenti, si parla di **pseudorepliche**, contrapposte alle **repliche vere**.

Il numero di repliche dipende dal tipo di esperimento: pi  sono e meglio , anche se   necessario trovare un equilibrio accettabile tra precisione e costo dell'esperimento. Nella sperimentazione di campo, 2 repliche sono poche, 3 appena sufficienti, 4 costituiscono la situazione pi  comune, mentre un numero maggiore di repliche   abbastanza raro, non solo per la difficolt  di seguire l'esperimento, ma anche perch  aumentano la dimensione della prova e, di conseguenza, la variabilit  del terreno.

### 3.2.3 Randomizzazione

L'indipendenza di manipolazione non garantisce da sola un esperimento corretto. Infatti potrebbe accadere che le caratteristiche innate dei soggetti, o una qualche 'intrusione' influenzino in modo sistematico tutte le unit  sperimentali trattate nello stesso modo, cos  da confondersi con l'effetto del trattamento. Un esempio banale   che potremmo somministrare un farmaco a quattro soggetti in modo totalmente indipendente, ma se i quattro soggetti fossero sistematicamente pi  alti di quelli non trattati finiremmo per confondere una caratteristica innata con l'effetto del farmaco. Oppure, se le repliche

di un certo trattamento si trovassero tutte vicine alla scolina, potrebbero essere pi  danneggiate delle altre unit sperimentali dal ristagno idrico, il cui effetto si confonderebbe con quello del trattamento stesso.

Questi problemi sono particolarmente insidiosi e si nascondono anche dietro ai particolari apparentemente pi  insignificanti. La randomizzazione   l'unico sistema per evitare, o almeno rendere molto improbabile, la confusione dell'effetto del trattamento con fattori casuali e/o comunque diversi dal trattamento stesso. La randomizzazione si declina in vari modi:

1. allocazione casuale del trattamento alle unit sperimentali. Gli esperimenti che prevedono l'allocazione del trattamento sono detti 'manipolativi' o 'disegnati'.
2. A volte l'allocazione del trattamento non   possibile o non   etica. Se volessimo studiare l'effetto delle cinture di sicurezza nell'evitare infortuni gravi, non potremmo certamente provocare incidenti deliberati. In questo caso la randomizzazione   legata alla scelta casuale di soggetti che sono 'naturalmente' trattati. Esperimenti di questi tipo, si dicono **osservazionali**. Un esempio   la valutazione dell'effetto dell'inquinamento con metalli pesanti nella salute degli animali: ovviamente non possibile, se non su piccola scala, realizzare il livello di inquinamento desiderato e, pertanto, dovremo scegliere soggetti che sono naturalmente sottoposti a questo genere di inquinamento, magari perch  vivono vicino a zone industriali.
3. Se i soggetti sono immobili, la randomizzazione ha anche una connotazione legata alla disposizione spaziale e/o temporale casuale.

L'assegnazione casuale del trattamento, o la selezione casuale dei soggetti trattati, fanno s  che tutti i soggetti abbiano la stessa probabilit  di ricevere qualunque trattamento oppure qualunque intrusione casuale. In questo modo, la probabilit  che tutte le repliche di un trattamento abbiano qualche caratteristica innata o qualche intrusione comune che li penalizzi/avvantaggi viene minimizzata. Di conseguenza, confondere l'effetto del trattamento con variabilit  casuale ('confounding'), anche se teoricamente possibile, diviene altamente improbabile.

### Gradienti e blocking

Un esperimento in cui l'allocazione del trattamento, o la scelta dei soggetti trattati, o la disposizione spaziale dei soggetti sono totalmente casuali si dice 'completamente randomizzato'. E' perfettamente valido, perch  non pone

dubbi fondati di inaccuratezza. Tuttavia, in alcune circostanze possibile porre restrizioni (vincoli) alla randomizzazione, perch ci porta ad un esperimento pi preciso.

In particolare, le unit sperimentali possono presentare delle differenze, ad esempio di fertilit, oppure di sesso. Ad esempio, randomizzare completamente l’allocazione dei trattamenti potrebbe far si che tra le repliche di un trattamento vi siano pi maschi che femmine, il che crea un certo livello di ‘confounding’. Pertanto potrebbe essere utile divider i soggetti in due gruppi (maschi e femmine), oppure in pi gruppi (molto fertile, mediamente fertile, poco fertile. . . ) e randomizzare i trattamenti all’interno di ogni gruppo.

In generale, il *blocking* consiste nel suddividere i soggetti in gruppi uniformi e ripetere lo stesso esperimento (o parte di esso) all’interno di ciascun gruppo, cio in una situazione di maggiore omogeneit.

Il raggruppamento delle unit sperimentali pu tener conto di:

1. vicinanza spaziale (campi, parcelle, stalle . . . )
2. caratteristiche fisiche (et, peso, sesso . . . )
3. vicinanza temporale
4. gestione dei compiti (tecnico, valutatore, giudice . . . )

Chiaramente, randomizzare all’interno del gruppo invece che randomizzare completamente crea un vincolo. A volte i vincoli sono pi di uno. Vediamo un esempio. Una certa operazione industriale richiede un solo operatore per essere portata a termine, ma pu essere eseguita in quattro modi diversi. Pianificate un esperimento per stabilire qual il metodo pi veloce, avendo a disposizione solo quattro operatori.

L’unit sperimentale il lavoratore. I metodi sono quattro e, volendo lavorare con quattro repliche, avremmo bisogno di sedici operatori per disegnare un esperimento completamente randomizzato. Possiamo tuttavia considerare che un operatore, in quattro turni successivi, pu operare con tutti e quattro i metodi. Quindi possiamo disegnare un esperimento in cui il turno fa da unit sperimentale e l’operatore fa da blocco (blocchi randomizzati). Tuttavia, in ogni blocco (operatore) vi un gradiente, nel senso che i turni successivi al primo sono via via meno efficienti, perch l’operatore accumula stanchezza. Per tener conto di questo potremmo allora introdurre un vincolo ulteriore, per ogni operatore, randomizzando i quattro metodi tra i turni, in modo che ogni metodo, in operatori diversi, capiti in tutti i turni. In sostanza, l’operatore fa da blocco, perch in esso sono contenuti tutti i metodi. Ma anche il turno (per tutti gli operatori) fa da blocco, in quanto in esso sono

ancora contenuti tutti i metodi. Se non vi è chiaro, ci torneremo sopra più tardi.

Posto che non si deve violare l'indipendenza delle repliche, l'inclusione di vincoli alla randomizzazione è consentita, **ma questa deve sempre essere tenuta presente in fase di analisi dei dati.**

Ronald Fisher diceva “*Analyse them as you have randomised them*”. Meglio seguire il consiglio.

### E se ricercatori/soggetti sono influenzabili?

Per concludere questa parte, è opportuno menzionare il fatto che, in un esperimento scientifico, il fatto che lo sperimentatore e il soggetto siano coscienti del trattamento somministrato può portare a risultati distorti. Per esempio, nell'eseguire un rilievo, lo sperimentatore può essere influenzato dal sapere con quale diserbante è stata trattata una parcella, cercando inconsciamente conferme alle sue conoscenze pregresse. D'altro canto, nei soggetti sperimentali dotati di coscienza (uomo) sapere di essere stati trattati può influenzare l'esito del trattamento (effetto placebo).

Per evitare questi problemi, soprattutto in ambito medico, un esperimento può essere pianificato come:

1. cieco: l'unità sperimentale o lo sperimentatore non sono coscienti dei dettagli del trattamento;
2. doppio cieco: né l'unità sperimentale né lo sperimentatore sono a conoscenza dei dettagli del trattamento

Un esperimento cieco e/o doppio cieco possono non essere eticamente corretti oppure inutili, nel qual caso si torna ad un esperimento tradizionale ‘aperto’ (*open experiment*: Tutti sanno tutto')

### 3.2.4 Esperimenti non validi

A questo punto dovrebbero essere chiare le caratteristiche di un esperimento valido. A completamento, cerchiamo di elencare le caratteristiche di un esperimento non valido.

1. Cattivo controllo degli errori
2. Fondati sospetti di confounding
3. Mancanza di repliche vere

4. Confusione tra repliche vere e pseudo-repliche
5. Mancanza di randomizzazione
6. Presenza di vincoli alla randomizzazione, trascurati in fase di analisi.

Le conseguenze di queste problematiche sono abbastanza diverse.

### Cattivo controllo degli errori

Bisogna verificare se il problema relativo a questioni come la mancanza di scrupolosità, l'uso di soggetti poco omogenei o di un ambiente poco omogeneo, o altri aspetti che inficiano solo la precisione, ma non l'accuratezza dell'esperimento. In questo caso, l'esperimento ancora valido (accurato), ma la bassa precisione probabilmente impedirà di trarre conclusioni forti. Quindi, un esperimento impreciso si 'elimina' da solo, perché sarà inconclusivo. Di questi esperimenti bisogna comunque diffidare, soprattutto quando siano pianificati per mostrare l'assenza di differenze tra due trattamenti alternativi. Mostrare l'assenza di differenze facile: basta fare male un esperimento, in modo che vi sia un alto livello di incertezza e quindi l'evidenza scientifica sia molto debole.

Diversa la situazione in cui un cattivo controllo degli errori, ad esempio l'adozione di metodi sbagliati, porta a mancanza di accuratezza, cioè a risultati che non riflettono la realtà (campionamento sbagliato, ad esempio; oppure strumenti non tarati; impiego di metodi non validati e/o non accettabili). In questo caso venendo a mancare l'accuratezza, l'esperimento deve essere rigettato, in quanto non fornisce informazioni realistiche.

### Confounding e correlazione spuria

Abbiamo appena menzionato il problema fondamentale della ricerca, cioè il **confounding**, vale a dire la confusione tra l'effetto del trattamento e un qualche altro effetto casuale, legato alle caratteristiche innate del soggetto o a qualche intrusione più o meno 'demoniaca'. Abbiamo detto che non possiamo mai avere la certezza dell'assenza di confounding, ma abbiamo anche detto che l'adozione di una pratica sperimentale corretta ne minimizza la probabilità.

Chiaramente, rimangono dei rischi che sono tipici di situazioni nelle quali il controllo adottato non è perfetto, come capita, ad esempio, negli esperimenti osservazionali. In questo ambito piuttosto temuta la cosiddetta 'correlazione

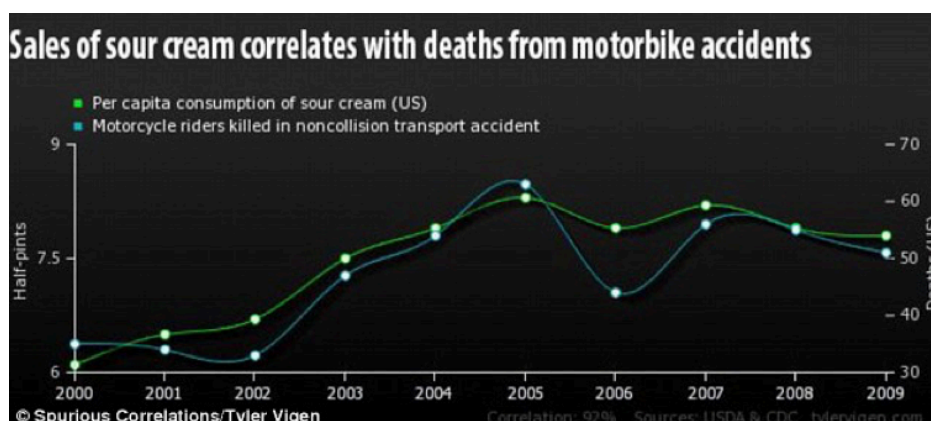


Figura 3.3: Esempio di correlazione spuria

spuria', una forma di confounding casuale per cui due variabili variano congiuntamente (sono direttamente o inversamente proporzionali), ma in modo del tutto casuale. Esistono, ad esempio, dati che mostrano una chiara correlazione tra le vendite di panna acida e le morti per incidenti in motocicletta. Chiaramente, non esistono spiegazioni scientifiche per questo effetto, che, ovviamente, del tutto casuale. Il problema che questa correlazione spuria non è sempre così semplice da rintracciare.

A volte il confounding non è casuale, ma legato ad una variabile esterna che si agisce all'insaputa dello sperimentatore. Ad esempio, è stato osservato che il tasso di crimini è più alto nelle città che hanno più chiese. La spiegazione di questo paradosso sta nel fatto che esiste un 'confounder', cioè l'ampiezza della popolazione. Nelle grandi città si riscontrano sia una maggiore incidenza criminale, sia un grande numero di chiese. In sostanza, la popolazione determina sia l'elevato numero di chiese che l'elevato numero di crimini, ma queste ultime due variabili non sono legate tra loro da una relazione causa-effetto (A implica B e A implica C, ma B non implica C).

Il confounding non casuale è spesso difficile da evidenziare, soprattutto se le correlazioni misurate sono spiegabili. Inoltre, non è eliminabile con un'accurata randomizzazione, ma solo con l'esecuzione di un esperimento totalmente controllato, nel quale ci si preoccupa di rilevare tutte le variabili necessarie per spiegare gli effetti riscontrati. Di questo è importante tener conto soprattutto negli esperimenti osservazionali, dove il controllo è sempre più difficile e meno completo.

**Pseudo-repliche e randomizzazione poco attenta**

Per evidenziare questi problemi e comprendere meglio la differenza tra un esperimento corretto e uno non corretto, utilissima la classificazione fatta da Hurlbert (1984), che riportiamo di seguito.

Vengono mostrati 8 soggetti, sottoposti a due trattamenti (bianco e nero), con 8 disegni sperimentali diversi.

Il disegno A1 corretto, in quanto si tratta di un esperimento completamente randomizzato. Ugualmente, valido il disegno A2, nel quale le unit sperimentali sono state divise in quattro gruppi omogenei e sono state trattate in modo randomizzato all'interno di ogni gruppo.

Il disegno A3 quantomeno 'sospetto': vi sono repliche vere, ma l'allocazione dei trattamenti non randomizzata ed avviene con un processo sistematico per il quale 'nero' e 'bianco' si alternano. Cosa succederebbe se vi fosse un gradiente di fertilit decrescente da destra verso sinistra? Le unit nere sarebbero avvantaggiate rispetto alle bianche! Insomma, rimangono sospetti di confounding, a meno che non si sia assolutamente certi dell'assenza di gradienti, come capita ad esempio se all'interno dei blocchi, dobbiamo creare una sequenza spazio-temporale. Vediamo tre esempi:

1. ho quattro piante e, per ogni pianta, voglio confrontare un ramo basso con uno alto: evidente che i due trattamenti sono sempre ordinati in modo sistematico (basso prima di alto).
2. Dobbiamo valutare l'effetto di fitofarmaci somministrati in due epoche diverse (accestimento e inizio-levata); anche qui non possiamo randomizzare, giacch un'epoca precede sempre l'altra.
3. Dobbiamo confrontare la presenza di residui di un fitofarmaco a due profondit e non possiamo randomizzare, perch una profondit precede sempre l'altra nello spazio.

In queste situazioni l'esperimento rimane valido, anche se la randomizzazione segue un processo sistematico e non casuale.

Il disegno B1 usualmente invalido: non vi randomizzazione e ci massimizza i problemi del disegno A3: la separazione delle unit sperimentali 'bianche' e 'nere' non consente una valutazione adeguata dell'effetto del trattamento, che confuso con ogni potenziale differenza tra la parte destra e la sinistra dell'ambiente in cui la sperimentazione viene eseguita. Ovviamente, la separazione pu essere non solo spaziale, ma anche temporale. Anche in questo



DESIGN TYPE	SCHEMA
A-1 Completely Randomized	
A-2 Randomized Block	
A-3 Systematic	
B-1 Simple Segregation	
B-2 Clumped Segregation	
B-3 Isolative Segregation	
B-4 Randomized, but with inter-dependent replicates	
B-5 No replication	

from H

Figura 3.4: Indicazioni per una corretta randomizzazione (Hurlbert, 1984)

caso diamo alcuni esempi in cui una situazione come quella descritta in B1 valida:

1. Vogliamo confrontare la produzione in pianura e in collina. Ovviamente dobbiamo scegliere campioni in due situazioni fisicamente separate
2. Vogliamo confrontare la pescosità di due laghetti
3. Vogliamo confrontare la produttività di due campi contigui.

Queste situazioni sono valide, anche se con una restrizione: non siamo in grado di stabilire a chi debba essere attribuito l'effetto. Ad esempio, per la prima situazione, pianura e collina possono dare produzioni diverse per il suolo diverso, il clima diverso, la precessione colturale diversa o un qualunque altro elemento che differenzi le due località.

Il disegno B2 analogo al disegno B1, ma il problema è più grave, perché la separazione fisica è più evidente. Questo disegno è totalmente sbagliato, a meno che non siamo specificatamente interessati all'effetto località (vedi sopra).

Il disegno B3 analogo al disegno B2, ma costituisce una situazione molto frequente nella pratica scientifica. Immaginiamo infatti di voler confrontare la germinazione dei semi a due temperature diverse, utilizzando due camere climatiche e mettendo, in ognuna di esse, quattro capsule Petri identiche. In questa situazione, l'effetto temperatura è totalmente confuso con l'effetto 'camera climatica (località)' e risente di ogni malfunzionamento relativo ad una sola delle due camere. Inoltre, le unità sperimentali con lo stesso trattamento di temperature non sono manipolate in modo indipendente, dato che condividono la stessa camera climatica. Di conseguenza, non si può parlare di repliche vere, bensì di **pseudorepliche**.

Altri esempi di **pseudorepliche** sono schematizzati con il codice B4. Ad esempio:

1. trattare piante in vaso ed analizzare in modo indipendente i singoli individui invece che tutto il vaso;
2. trattare una parcella di terreno e prelevare da essa più campioni, analizzandoli separatamente;
3. trattare una capsula Petri ed analizzare separatamente i semi germinati al suo interno.

Questi disegni, in assenza di repliche vere aggiuntive non sono da considerarsi validi. Ad esempio, se io ho due vasetti trattati in modo totalmente indipendente e da ciascuno di essi prelevo due piante e le analizzo separatamente, il disegno è caratterizzato da due repliche vere e due pseudorepliche per ogni replica ed è, pertanto, valido.

Il disegno B5 invece evidentemente invalido, per totale mancanza di repliche.

---

### 3.3 Progettazione di un esperimento (protocollo)

Qualunque sia l'ambito scientifico, in ogni esperimento possiamo individuare alcune fasi fondamentali, che proviamo ad elencare:

1. Individuazione del background (ricerca bibliografica)
2. ipotesi scientifica;
3. definizione dell'obiettivo;
4. identificazione dei fattore/i sperimentale/i;
5. identificazione dei soggetti sperimentali e delle repliche;
6. identificazione delle variabili da rilevare;
7. allocazione randomizzata dei trattamenti (mappa dell'esperimento)
8. Esecuzione dell'esperimento

Nell'analizzare questi aspetti, faremo riferimento ad alcuni esempi pratici, che verranno indicati tra breve.

#### 3.3.1 Ipotesi scientifica → obiettivo dell'esperimento

Trascurando la parte di ricerca bibliografica, che pur fondamentale, nel metodo scientifico galileiano, il punto di partenza di un esperimento è l'**ipotesi scientifica**, che determina l'obiettivo dell'esperimento. Si tratta del passaggio fondamentale dal quale dipende in modo logico tutto il lavoro successivo. Gli obiettivi debbono essere:

1. rilevanti
2. chiaramente definiti;
3. specifici;
4. misurabili;
5. raggiungibili/realistici;
6. temporalmente organizzati.

Il rischio che si corre con obiettivi mal posti è quello di eseguire una ricerca dispersiva, con raccolta di dati non necessari e/o mancanza di dati fonda-

mentali, con costi pi elevati del necessario e un uso poco efficiente delle risorse. In genere, prima si definisce un obiettivo generale, seguito da uno o pi obiettivi specifici, in genere proiettati su un pi breve spazio temporale e che possono essere visti anche come le fasi necessarie per raggiungere l'obiettivo generale.

Poniamo quattro esempi pratici.

### 3.3.2 Casi di studio - 1

#### Esempio 1 - Diserbo chimico

Si suppone che gli erbicidi A, B e C siano pi efficaci di D, E ed F verso *Solanum nigrum*, una comune pianta infestante delle colture di pomodoro. L'obiettivo generale della ricerca sar quello di trovare un'efficace soluzione per l'eliminazione di *Solanum nigrum* dal pomodoro. Gli obiettivi specifici saranno:

1. valutare l'efficacia erbicida di A, B e C, confrontandola con quella di D, E ed F;
2. valutare la selettivit degli anzidetti erbicidi verso il pomodoro;

#### Esempio 2 - Valutazione varietale

L'ipotesi che le variet di girasole A, B e C non hanno la stessa base genetica e quindi non sono tutte ugualmente produttive. L'obiettivo generale quello di capire quale tra A, B e C sia pi adatta alle condizioni pedoclimatiche della collina Umbra.

Gli obiettivi specifici sono quelli di valutare:

1. produttivit di A, B e C
2. stabilit produttiva di A, B e C

#### Esempio 3 - Diserbo parziale

Nella barbabietola da zucchero, il diserbo localizzato lungo la fila consente di diminuire l'impiego di erbicidi. Tuttavia, se la coltura precedente ha prodotto semi e se non abbiamo effettuato una lavorazione profonda per interrarli, la

coltura sar pi infestata e quindi sar pi difficile ottenere una buona produttivit con il diserbo parziale.

Su questa ipotesi costruiamo un esperimento volto a valutare l'interazione tra lavorazione del terreno e diserbo chimico. Per raggiungere questo obiettivo generale, proveremo a valutare se:

1. il diserbo parziale consente di ottenere produzioni comparabili a quelle del diserbo totale; 2. l'effetto indipendente dalla lavorazione effettuata.

#### **Esempio 4 - Colture poliennali**

L'ipotesi scientifica affine a quella dell'esempio 2, ma, in questo caso, vogliamo porre a confronto tre variet di erba medica (A, B e C). La differenza sta nel fatto che l'erba medica una coltura poliennale e quindi vogliamo capire se il giudizio di merito indipendente dall'anno di coltivazione.

I nostri obiettivi specifici saranno quindi:

1. valutare la produttivit media delle variet in prova
2. valutare le oscillazioni nei quattro anni di durata del ciclo erboso

#### **Esempio 5 - Inquinamento da micotossine**

Secondo le notizie in bibliografia, i datteri confezionati in vendita nei supermercati contengono elevate quantit di micotossine. L'obiettivo generale quello di verificare il livello di infestazione e vedere se questo cambia con il metodo di confezionamento.

---

### **3.3.3 Identificazione dei fattori sperimentali**

Dopo aver definito l'obiettivo di un esperimento, necessario chiarire esattamente gli stimoli a cui saranno sottoposte le unit sperimentali. Uno 'stimolo' sperimentale prende il nome di **fattore sperimentale**, che pu avere pi **livelli**. I livelli del fattore sperimentale prendono il nome di **trattamenti (o tesi) sperimentali**.

### 3.3.4 Esperimenti (multi)fattoriali

In alcuni casi è necessario inserire in prova più di un fattore sperimentale. In questo caso si parla di esperimenti **fattoriali**, che possono essere **incrociati (crossed)** quando sono presenti in prova tutte le possibili combinazioni dei livelli di ogni fattore, oppure di esperimenti **innestati (nested)** quando i livelli di un fattore cambiano al cambiare dei livelli dell'altro.

Ad esempio:

1. Immaginiamo di voler studiare due fattori sperimentali: la varietà di girasole (tre livelli: A, B e C) e la concimazione (2 livelli: pollino e urea). Abbiamo quindi 6 possibili trattamenti (combinazioni): A-pollina, A-urea, B-pollina, B-urea, C-pollina e C-urea. Il disegno completamente incrociato.
2. Immaginiamo di voler confrontare due specie in agricoltura biologica (orzo e triticale), con tre varietà ciascuna (A, B e C per orzo, D, E e F per triticale). Anche in questo caso abbiamo sei trattamenti: orzo-A, orzo-B, orzo-C, triticale-D, triticale-E e triticale-F, ma il disegno innestato, perché per il fattore sperimentale 'varietà' i livelli cambiano a seconda dei livelli del fattore 'specie'.

### 3.3.5 Aggiungere un controllo?

In alcuni casi si pone il problema di inserire in prova un trattamento che funga da riferimento per tutti gli altri. In questi casi si parla comunemente di **controllo** o **testimone**, che può essere

- non sottoposto a trattamento
- trattato con placebo
- trattato secondo le modalità usuali di riferimento

### 3.3.6 Fattori sperimentali di trattamento e di blocco

Finora abbiamo menzionato quelli che, in lingua inglese, vengono definiti *treatment factor* (trattamenti sperimentali). Tuttavia, possono esserci altri fattori sperimentali non allocati, ma 'innati' e legati alla collocazione spazio-temporale o alle caratteristiche dei soggetti. Questi fattori vengono definiti, sempre in inglese, *blocking factors*. Di questi fanno parte, ad esempio, il

blocco, la localit ed ogni altro elemento che permette di raggruppare i soggetti. Anche questi *blocking factors* devono essere chiaramente identificati ed elencati.

Su questa base identifichiamo i fattori sperimentali negli esempi precedenti.

### 3.3.7 Casi di studio - 2

#### Esempio 1

Il fattore sperimentale oggetto di studio sar il diserbo del pomodoro, con 5 livelli inseriti in prova (6 trattamenti sperimentali): A, B, C, D, E ed F. Inoltre, si ritiene opportuno inserire in prova un testimone non trattato (NT), che ci permetter di quantificare la percentuale di malerbe controllate. Inoltre, sar anche necessario inserire in prova un testimone scerbato manualmente (ST), che ci permetter di quantificare eventuali perdite produttive dovute alla competizione residua o alla fitotossicit del trattamento. In totale, avremo quindi 8 tesi sperimentali. Come usuale in pieno campo, l'esperimento verr disegnato a blocchi randomizzati e sar pertanto necessario inserire un fattore di blocco.

#### Esempio 2

Il fattore sperimentale in studio sar la variet di girasole con 3 livelli inclusi in prova (variet A, B e C). Come testimone, inseriremo la variet di riferimento per la zona (D). Dato che eseguiremo questa prova su un terreno nel quale vi sono due chiari gradienti di fertilit, disegneremo l'esperimento considerando due fattori di blocco: trasversale e longitudinale (spiego meglio tra poco...). Poich dobbiamo valutare la stabilit produttiva, dovremo ripetere l'esperimento pi volte (es. in tre anni diversi) e quindi avremo un secondo fattore sperimentale, incrociato con il primo.

#### Esempio 3

In questo caso avremo due fattori sperimentali incrociati: il diserbo con due livelli (totale o parziale, localizzato sulla fila) e la lavorazione con tre livelli (aratura profonda, aratura superficiale e *minimum tillage*). Non vi la

necessit di un testimone, ma avremo la necessit di un fattore di blocco. In totale, avremo sei tesi sperimentali.

#### **Esempio 4**

Il fattore sperimentale in studio sar la variet di erba medica con 3 livelli inclusi in prova (variet A, B e C) ai quali aggiungiamo il riferimento di zona (D) come testimone. Come nel caso del girasole, dovremo valutare la stabilit produttiva negli anni, ma, dato che abbiamo una coltura poliennale, non avremo bisogno di ripetere la prova, ma potremo ripetere le osservazioni per quattro anni sulla stessa prova.

#### **Esempio 5**

Per questo esperimento vengono considerate tre diverse modalit di confezionamento (carta, busta di plastica, scatola di plastica perforata). Non vi necessit di un testimone, ma, dato che le diverse confezioni verranno acquistate in diversi supermercati e dato che sospettiamo differenze nella conservazione tra un supermercato e l'altro, utilizzeremo il supermercato come fattore di raggruppamento.

---

### **3.3.8 Identificazione delle unit sperimentali e delle repliche**

#### **Cornice di campionamento e numero di repliche**

Per i primi quattro esempi verranno eseguite prove di pieno campo, nella Media Valle del Tevere, che rappresenta la cornice di campionamento adeguata per l'obiettivo previsto. Sappiamo di dover selezionare appezzamenti di terreno

1. rappresentativi della Media Valle del Tevere,
2. omogenei.

L'omogeneit dell'ambiente fondamentale per aumentare la precisione dell'esperimento. La scelta dell'appezzamento chiaramente fondamentale ed



guidata dall'esperienza, tenendo conto anche di aspetti come la facilità di accesso e la vicinanza di strutture (laboratori, capannoni...) che consentano un'accurata esecuzione degli eventuali prelievi.

Oltre alla scelta dell'appezzamento, si possono anche utilizzare alcune strategie per favorire una buona omogeneità delle parcelle. Spesso si usa far precedere la prova da una coltura di 'omogeneizzazione', ad esempio avena, che molto avida di azoto e lascia nel terreno poca fertilità residua. Oppure un prato di erba medica, che, grazie agli sfalci periodici, lascia il terreno libero da piante infestanti.

Trattandosi di esperimenti di campo, il numero di repliche sarà di quattro, per ogni trattamento e l'unità sperimentale sarà una parcella, della quale dovremo valutare forma e dimensioni.

Per il quinto esempio, la cornice di campionamento sarà data dal territorio del comune di Perugia. L'unità sperimentale sarà la confezione e la scelta del numero di repliche dovrà essere compatibile con la capacità di analisi per la determinazione dell'inquinamento da micotossine. È ragionevole pensare che 30 repliche (90 confezioni totali) possano essere adeguate per rappresentatività e facilità di gestione.

### Campionamento delle unità sperimentali

Per le quattro prove di pieno campo, una volta scelto l'appezzamento, dovremo campionare le parcelle di terreno. Questa operazione viene usualmente eseguita su carta, redigendo la **mappa dell'esperimento**. In primo luogo, si decide la **dimensione e la forma della parcella**.

L'aspetto fondamentale che ogni parcella deve contenere è un numero di piante sufficientemente alto da essere rappresentativo. Per questo motivo le colture a bassa fittezza hanno sempre bisogno di parcelle più grandi che non quelle ad alta fittezza. La dimensione non deve tuttavia eccedere una certa soglia, in quanto con essa aumenta anche la variabilità del terreno e, di conseguenza, diminuisce l'omogeneità dell'esperimento. Per questo motivo, talvolta si preferisce diminuire la dimensione delle parcelle ed, avendo lo spazio sufficiente, aumentare il numero delle repliche.

Nello stabilire la dimensione delle parcelle, dovremo tener conto del fatto che la parte più delicata è il bordo, in quanto le piante che si trovano lungo il bordo esterno risentono di condizioni diverse dalle altre piante situate al centro della parcella (**effetto bordo**). Questo determina variabilità all'interno

della parcella, che possiamo minimizzare raccogliendo solo la parte centrale. Si viene così a distinguere la superficie totale della parcella dalla superficie di raccolta (**superficie utile**), che può essere anche molto minore di quella totale.

In generale si ritiene che le colture ad elevata fittezza (frumento, cereali, erba medica...) dovrebbero avere parcelle di almeno  $10\text{-}20\text{ m}^2$ , mentre a bassa fittezza (mais, girasole...) dovrebbero avere parcelle di almeno  $20\text{-}40\text{ m}^2$ . Queste dimensioni sono riferite alla superficie utile di raccolta, non alla dimensione totale.

Per quanto riguarda la forma, le parcelle quadrate minimizzano l'effetto bordo, perché, a parità di superficie, hanno un perimetro più basso. Tuttavia esse sono di più difficile gestione, in quanto, considerando il fronte di lavoro di una seminatrice o una mietitrebbiatrice parcellare, possono richiedere la semina o la raccolta in più passate, il che finisce per essere una fonte di errore. Per questo motivo le parcelle sono usualmente rettangolari, con una larghezza pari a quella della macchina impiegata per la semina.

Per i quattro esempi in studio potremmo utilizzare una dimensione delle parcelle di  $20\text{ m}^2$  per l'erba medica (2 m di larghezza per 10 m di lunghezza) e di  $22.5\text{ m}^2$  per pomodoro, mais e barbabietola da zucchero (2.25 m di larghezza per 10 metri di lunghezza).

A questo punto possiamo redigere la mappa per il primo esempio. Dato che il campo di prova largo 30 metri e lungo 400 metri, potremmo immaginare di disegnare otto file di parcelle in senso trasversale ( $8 \times 2.25\text{ m} = 18\text{ m}$ ), di modo che l'esperimento non sia troppo lungo (il che ne aumenterebbe la variabilità), ma rimanga spazio sufficiente ai lati, per evitare di avvicinarsi troppo alle scoline, dove possono manifestarsi ristagni idrici.

La mappa dell'esperimento è un elemento fondamentale e deve riportare tutte le informazioni relative al disegno sperimentale. È anche importante indicare la direzione del Nord, in modo da facilitare l'orientamento della mappa stessa. Notare inoltre che, intorno alla prova, abbiamo sistemato altre parcelle fuori esperimento con funzione di 'bordi'. In questo modo si evita che i bordi esterni delle parcelle esterne siano esposti a condizioni molto diverse dagli altri, cosa che potrebbe accentuare l'effetto 'bordo', di cui abbiamo parlato in precedenza. Queste parcelle verranno trattate in modo ordinario (semina e diserbo tradizionale del pomodoro).

Per l'esperimento relativo all'esempio 5, l'unità sperimentale è una singola confezione di datteri, con le tipologie previste dal piano.

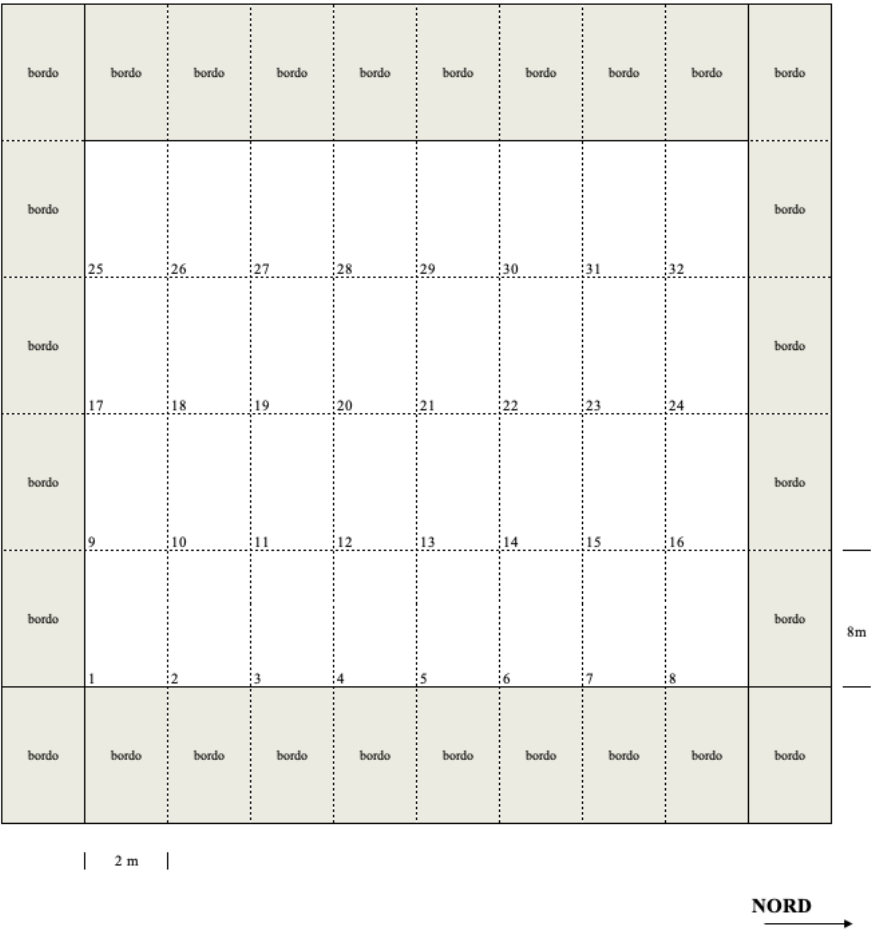


Figura 3.5: Mappa dell’esperimento relativo all esempio 1



Figura 3.6: Tipologie delle confezioni di datteri

Siccome abbastanza scomodo campionare confezioni di datteri casualmente all'interno del Comune di Perugia, si preferisce un campionamento stratificato, selezionando 10 supermercati rappresentativi, nelle zone più densamente popolate della città. All'interno di ogni supermercato, si selezioneranno casualmente tre repliche per ogni tipo di confezione.

### 3.3.9 Scelta delle variabili da rilevare

Durate e al termine dell'esperimento, sarà necessario rilevare le più importanti caratteristiche dei soggetti sperimentali, sia quelle innate, sia quelle indotte dai trattamenti sperimentali. Per ogni singolo carattere, l'insieme delle modalità/valori che ognuno dei soggetti presenta prende il nome di **variabile** (proprio perché varia, cioè assume diversi valori, a seconda del soggetto). Ad esempio, quando stiamo studiando l'effetto di due diserbanti su piante infestanti appartenenti ad una certa specie, posto che l'unità sperimentale costituita da una singola pianta, possiamo avere le seguenti variabili: il prodotto diserbante con cui ogni pianta è stata trattata, il peso di ogni pianta prima del trattamento, il peso di ogni pianta dopo il trattamento.

Le variabili sperimentali possono essere molto diverse tra di loro ed è piuttosto importante saperle riconoscere, perché questo condiziona il tipo di analisi statistica da eseguire.

**Variabili nominali (categoriche)**

Le variabili nominali esprimono, per ciascun soggetto, l'appartenenza ad una determinata categoria o raggruppamento. L'unica caratteristica delle categorie è l'esclusività, cioè un soggetto che appartiene ad una di esse non può appartenere a nessuna delle altre. Variabili nominali sono, ad esempio, il sesso, la varietà, il tipo di diserbante impiegato, la modalità di lavorazione e così via. Le variabili categoriche permettono di raggruppare i soggetti, ma non possono essere utilizzate per fare calcoli, se non per definire le proporzioni dei soggetti in ciascun gruppo.

**Variabili ordinali**

Anche le variabili ordinali esprimono, per ciascun soggetto, l'appartenenza ad una determinata categoria o raggruppamento. Tuttavia, le diverse categorie sono caratterizzate, oltre che dall'esclusività, anche da una relazione di ordine, nel senso che è possibile stabilire una naturale graduatoria tra esse. Ad esempio, la risposta degli agricoltori a domande relative alla loro percezione sull'utilità di una pratica agronomica può essere espressa utilizzando una scala con sei categorie (0, 1, 2, 3, 4 e 5), in ordine crescente da 0 a 5. Di conseguenza possiamo confrontare categorie diverse ed esprimere un giudizio di ordine (2 maggiore di 1, 3 minore di 5), ma non possiamo eseguire operazioni matematiche, tipo sottrarre dalla categoria 3 la categoria 2 e così via, dato che la distanza tra le categorie non è necessariamente la stessa.

**Variabili quantitative discrete**

Le variabili discrete sono caratterizzate dal fatto che possiedono, oltre alle proprietà dell'esclusività e dell'ordine, anche quella dell'equidistanza tra gli attributi (es., in una scala a 5 punti, la distanza – o la differenza – fra 1 e 3 uguale a quella fra 2 e 4 e doppia di quella tra 1 e 2). Le variabili discrete consentono la gran parte delle operazioni matematiche e, spesso, possono essere analizzate con metodiche parametriche, facendo riferimento alla distribuzione normale, che, pur essendo continua, in alcune condizioni può essere assunta come buona approssimazione di molte distribuzioni discrete.

### **Variabili quantitative continue**

Le variabili quantitative continue possiedono tutte le propriet precedentemente esposte (esclusivit delle categorie, ordine, distanza) oltre alla continuit, almeno in un certo intervallo. Tipiche variabili continue sono l'altezza, la produzione, il tempo, la fittezza...

Dato che gli strumenti di misura nella realt sono caratterizzati da una certa risoluzione, si potrebbe arguire che misure su scala continua effettivamente non esistono. Tuttavia questo argomento pi teorico che pratico e, nella ricerca biologica, consideriamo continue tutte le misure nelle quali la risoluzione dello strumento sufficientemente piccola rispetto alla grandezza da misurare. Viceversa, le variabili continue sono piuttosto rare nelle scienze economiche e sociali in genere.

La quantit di informazione fornita dagli strumenti di valutazione cresce passando dalle scale nominali, di pi basso livello, a quelle quantitative continue, di livello pi elevato. Variabili esprimibili con scale quantitative continue o discrete possono essere espresse anche con scale qualitative, adottando un'opportuna operazione di classamento. Il contrario, cio trasformare in quantitativa una variabile qualitativa, non invece possibile.

### **Rilievi visivi e sensoriali**

Nella pratica sperimentale molto frequente l'adozione di metodi di rilievo basati sull'osservazione di un fenomeno attraverso uno dei sensi (pi spesso, la vista, ma anche gusto e olfatto) e l'assegnazione di una valutazione su scala categorica, ordinale o, con un po' di prudenza, quantitativa discreta o continua. Ad esempio, il ricoprimento delle piante infestanti, la percentuale di controllo di un erbicida e la sua fitotossicit vengono spesso rilevati visivamente, su scale da 0 a 100 o simili.

I vantaggi di questa tecnica sono molteplici:

1. Basso costo ed elevata velocit
2. Possibilit di tener conto di alcuni fattori perturbativi esterni, che sono esclusi dalla valutazione, contrariamente a quello che succede con metodi oggettivi di misura
3. non richiede strumentazione costosa

A questi vantaggi fanno da contraltare alcuni svantaggi, cio:

1. Minor precisione (in generale)

2. Soggettività
3. L'osservatore può essere prevenuto
4. Difficoltà di mantenere uniformità di giudizio
5. Richiede esperienza specifica e allenamento

I rilievi sensoriali sono ben accettati nella pratica scientifica in alcuni ambiti ben definiti, anche se richiedono attenzione nell'analisi dei dati non potendo essere assimilati *tout court* con le misure oggettive su scala continua.

### **Variabili di confondimento**

Quando si pianificano i rilievi da eseguire, oppure anche nel corso dell'esecuzione di un esperimento, bisogna tener presente non soltanto la variabile che esprime l'effetto del trattamento, ma anche tutte le variabili che misurano possibili fattori di confondimento.

Ad esempio, immaginiamo di voler valutare la produttività di una specie arborea in funzione della varietà. Immaginiamo anche di sapere che, per questa specie, la produttività dipende anche dall'età. Se facciamo un esperimento possiamo utilizzare alberi della stessa età per minimizzare la variabilità dei soggetti. Tuttavia, se questo non fosse possibile, per ogni albero dobbiamo rilevare non solo la produttività, ma anche l'età, in modo da poter valutare anche l'effetto di questo fattore aggiuntivo e separarlo dall'effetto della varietà. In questo modo l'esperimento diviene molto più preciso.

#### **3.3.10 Casi di studio - 3**

Per gli esempi in studio, immaginiamo per semplicità di dover rilevare la produzione per gli esempi da 1 a 4 e il contenuto di micotossine per l'esempio 5. Inoltre, per l'esempio 2, immaginiamo di dover rilevare anche il peso di mille semi. Per questo, prenderemo dalla produzione di granella di ogni parcella, quattro subcampioni da mille semi, da sottoporre a successive misure.

---

#### **3.3.11 Allocazione dei trattamenti**

Il problema dell'allocazione dei trattamenti non si pone con l'esempio 5, in quanto, trattandosi di un esperimento osservazionale, le confezioni sono già

‘naturalmente’ trattate, cio appartengono gi, all’atto del campionamento, alla tipologia di confezionamento prescelta.

Per quanto riguarda gli altri esempi, abbiamo gi redatto la mappa secondo le necessit. A questo punto si pone il problema di decidere quali parcelle trattare con cosa, nel rispetto dei trattamenti e delle repliche prescelte. Per questo fine, semplici esperimentipossono anche essere disegnati a mano; per esperimenti pi complessi potremo utilizzare il package *agricolae* in R (de Mendiburu, 2017).

### 3.3.12 Casi di studio - 4

#### Esempio 1

Questo esempio va disegnato a blocchi randomizzati; tuttavia, a titolo di esempio, esamineremo anche la possibilit che venga disegnato a randomizzazione completa. Quest’ultimo disegno il pi semplice e consiste nell’assegnare ogni trattamento a quattro parcelle casualmente scelte. Con R bisogner prima creare il vettore dei nomi delle tesi e il numero di repliche per tesi

```
library(agricolae)
trt <- c("A", "B", "C", "D", "E", "F", "NT", "TS")
reps <- rep(4, 8)
design <- design.crd(trt, r=reps, seed=777, serie=0)
design$book
```

```
##      plots r trt
## 1         1 1  E
## 2         2 1  C
## 3         3 1  B
## 4         4 2  C
## 5         5 1  F
## 6         6 1 TS
## 7         7 1 NT
## 8         8 1  D
## 9         9 2 NT
## 10        10 1  A
## 11        11 2 TS
## 12        12 2  F
## 13        13 3 NT
## 14        14 3  C
```



```
## 15      15 3  TS
## 16      16 2   D
## 17      17 3   D
## 18      18 2   E
## 19      19 3   E
## 20      20 4  NT
## 21      21 2   A
## 22      22 4   D
## 23      23 4   E
## 24      24 3   A
## 25      25 4   C
## 26      26 2   B
## 27      27 4   A
## 28      28 3   F
## 29      29 3   B
## 30      30 4  TS
## 31      31 4   F
## 32      32 4   B
```

Possiamo ora riportare la randomizzazione sulla mappa disegnata in precedenza.

Questo schema è eccellente se l'ambiente è molto uniforme. Tuttavia, nel caso di un esperimento di campo è lecito aspettarsi un gradiente trasversale, dato che il campo sarà certamente meno fertile vicino alle scoline. Per questo motivo disegneremo l'esperimento a blocchi randomizzati, dividendo prima l'apprezzamento in quattro blocchi perpendicolari al gradiente di fertilità. Ad esempio il blocco 1 conterrà le parcelle 1, 9, 17, 25, 2, 10, 18 e 26, cioè le prime due colonne della mappa, con un numero di parcelle esattamente uguali al numero delle tesi. Il blocco 2 conterrà le colonne 3 e 4 e così via. Dato che il gradiente trasversale, le parcelle di un stesso blocco saranno più omogenee che non parcelle su blocchi diversi. Dopo aver diviso la mappa in quattro blocchi di otto parcelle, possiamo allocare gli otto trattamenti a random all'interno di ogni blocco. Con R è possibile utilizzare il codice seguente (notare che la numerazione assegnata da R è diversa dalla nostra, anche se possiamo far riferimento ai valori crescenti all'interno di ogni blocco).

```
reps <- 4
designRCBD <- design.rcbd(trt, r=reps, seed=777, serie=2)
book2 <- designRCBD$book
book2
```

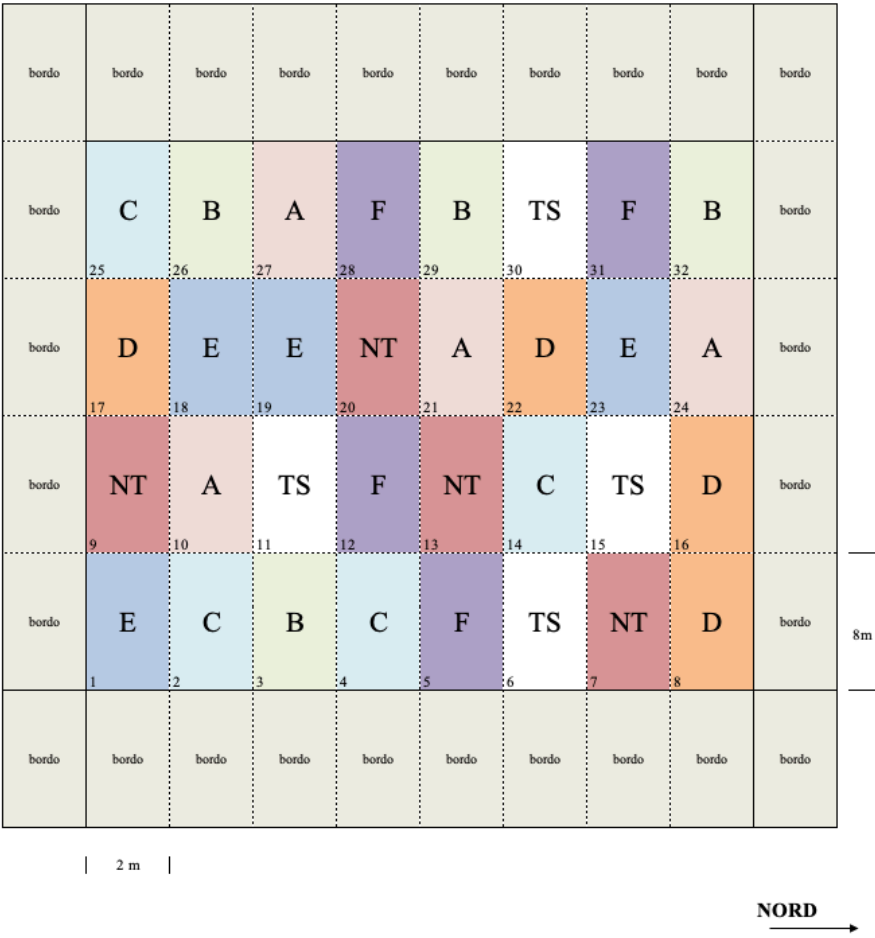


Figura 3.7: Schema sperimentale a randomizzazione completa per l'Esempio 1

```
##      plots block trt
## 1      101      1   E
## 2      102      1   B
## 3      103      1  NT
## 4      104      1   F
## 5      105      1   D
## 6      106      1  TS
## 7      107      1   C
## 8      108      1   A
## 9      201      2   F
## 10     202      2   A
## 11     203      2   C
## 12     204      2   E
## 13     205      2  TS
## 14     206      2   B
## 15     207      2  NT
## 16     208      2   D
## 17     301      3  TS
## 18     302      3  NT
## 19     303      3   F
## 20     304      3   A
## 21     305      3   B
## 22     306      3   E
## 23     307      3   C
## 24     308      3   D
## 25     401      4   D
## 26     402      4  TS
## 27     403      4   A
## 28     404      4   F
## 29     405      4   E
## 30     406      4   C
## 31     407      4   B
## 32     408      4  NT
```

```
zigzag(designRCBD) # zigzag numeration
```

```
##      plots block trt
## 1      101      1   E
## 2      102      1   B
## 3      103      1  NT
## 4      104      1   F
```

```
## 5      105      1    D
## 6      106      1   TS
## 7      107      1    C
## 8      108      1    A
## 9      208      2    F
## 10     207      2    A
## 11     206      2    C
## 12     205      2    E
## 13     204      2   TS
## 14     203      2    B
## 15     202      2   NT
## 16     201      2    D
## 17     301      3   TS
## 18     302      3   NT
## 19     303      3    F
## 20     304      3    A
## 21     305      3    B
## 22     306      3    E
## 23     307      3    C
## 24     308      3    D
## 25     408      4    D
## 26     407      4   TS
## 27     406      4    A
## 28     405      4    F
## 29     404      4    E
## 30     403      4    C
## 31     402      4    B
## 32     401      4   NT
```

```
print(designRCBD$sketch)
```

```
##      [,1] [,2] [,3] [,4] [,5] [,6] [,7] [,8]
## [1,] "E"  "B"  "NT" "F"  "D"  "TS" "C"  "A"
## [2,] "F"  "A"  "C"  "E"  "TS" "B"  "NT" "D"
## [3,] "TS" "NT" "F"  "A"  "B"  "E"  "C"  "D"
## [4,] "D"  "TS" "A"  "F"  "E"  "C"  "B"  "NT"
```

Anche in questo caso, riportiamo tutto sulla mappa.

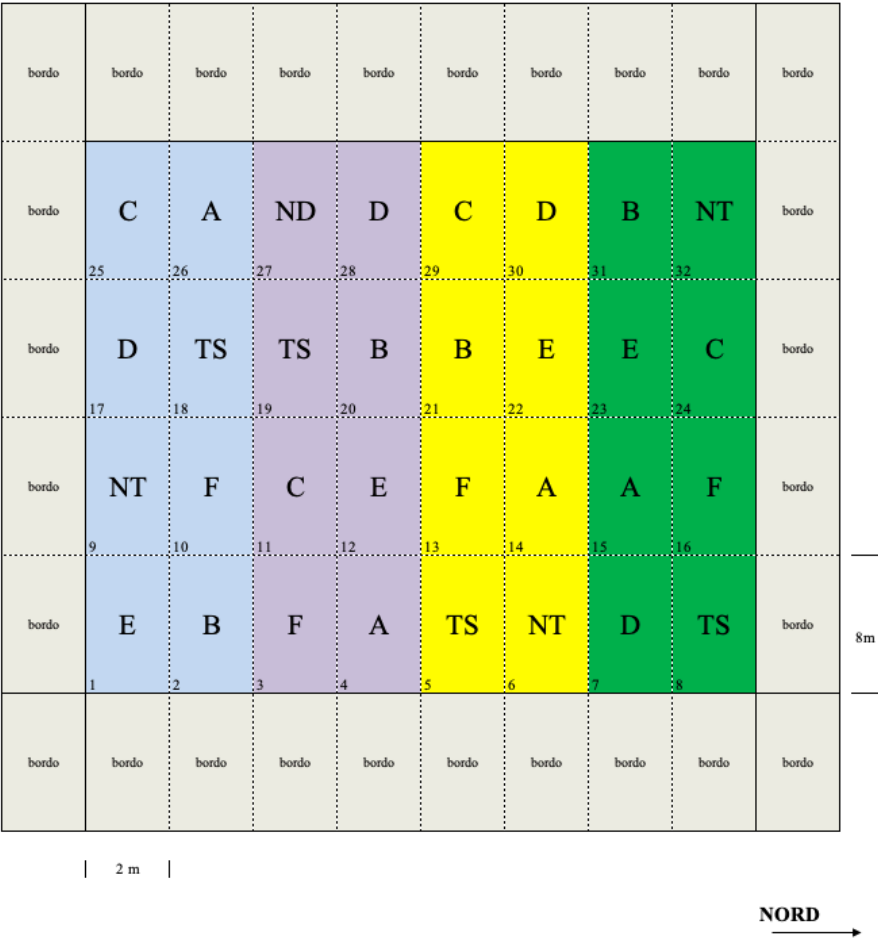


Figura 3.8: Schema sperimentale a blocchi randomizzati per l'Esempio 1

**Esempio 2**

In questo caso, per ognuno dei tre anni di prova, la mappa contiene una griglia 4 x 4, analoga a quella dell'esperimento precedente, ma pi piccola. Nella mappa potremo quindi identificare, esclusi i bordi, quattro colonne e quattro righe. Dato che abbiamo presupposto l'esistenza di un gradiente trasversale e longitudinale (tra righe e tra colonne), l'allocazione dei trattamenti dovr esser fatta in modo che ognuno di essi si trovi su ogni riga e ogni colonna. Questo tipo di disegno prende il nome di **Quadrato latino**.

Anche in questo caso potremo chiedere ad R di aiutarci a trovare la combinazione corretta (anche se questo potrebbe essere comodamente fatto a mano).

```
trt <- c("A", "B", "C", "D")
designLS <- design.lsd(trt, seed=543, serie=2)
designLS$book
```

```
##      plots row col trt
## 1      101   1   1   C
## 2      102   1   2   A
## 3      103   1   3   B
## 4      104   1   4   D
## 5      201   2   1   D
## 6      202   2   2   B
## 7      203   2   3   C
## 8      204   2   4   A
## 9      301   3   1   B
## 10     302   3   2   D
## 11     303   3   3   A
## 12     304   3   4   C
## 13     401   4   1   A
## 14     402   4   2   C
## 15     403   4   3   D
## 16     404   4   4   B
```

A questo punto dobbiamo considerare che questa prova deve essere ripetuta in tre anni. La ripetizione di una prova sempre fondamentale, in quanto consente di verificare non solo la replicabilit dell'esperimento (che dimostrata dalle repliche), ma anche la sua riproducibilit (riguardare le definizioni di replicabilit e riproducibilit). In questo caso poi la ripetizione dell'esperimen-

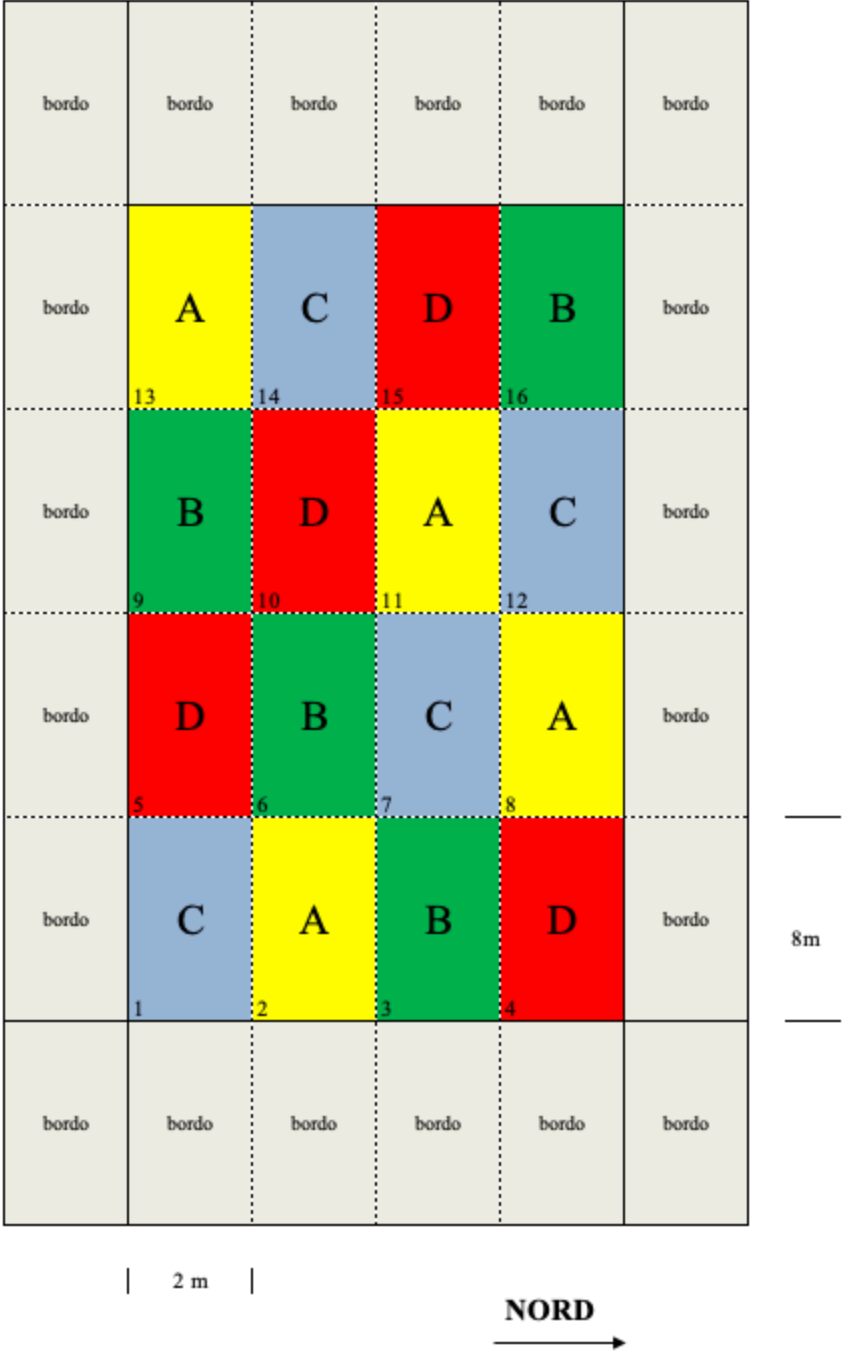


Figura 3.9: Schema sperimentale a quadrato latino per l'Esempio 2 (un anno)

to indispensabile per misurare la stabilit  produttiva, cio l'oscillazione delle produzioni da un anno all'altro.

Ovviamente   anche importante verificare la stabilit  produttiva da una localit  all'altra, che consente di valutare l'esistenza di macro-areali, nei quali   possibile consigliare le stesse variet . Un'aspetto fondamentale   comunque quello di **definire una diversa randomizzazione in ogni anno/localit **, per evitare che le stesse variet  siano sempre nelle stesse posizioni, che potrebbe dare origine a dubbi di confounding. La definizione delle randomizzazioni per il secondo e terzo anno   lasciata per esercizio.

Un'altro aspetto da considerare   la metodica impiegata per la determinazione del peso di 1000 semi. Abbiamo gi  visto che, per aumentare la precisione e la rappresentativit , da tutta la granella raccolta da una parcella preleviamo quattro lotti da 1000 semi, di cui determinare il peso. In questo modo, per ogni trattamento avremo 16 valori (quattro repliche x quattro lotti per replica). Ovviamente non possiamo affermare di avere 16 repliche, in quanto solo le parcelle sono da considerare repliche, in quanto ricevono il trattamento (variet ) in modo indipendente. I quattro lotti raccolti da ogni parcella sono unit  osservazionali (perch  ne viene rilevato il peso), ma non unit  sperimentali, perch  appartengono alla stessa parcella e non sono indipendenti. I quattro lotti si dicono **sub-repliche**, quindi il disegno ha quattro repliche e quattro sub-repliche per replica (**disegno a quadrato latino con sottocampionamento**). I due strati di errore (variabilit  tra repliche e variabilit  tra sub-repliche entro replica), devono essere mantenuti separati in fase di analisi, altrimenti l'analisi   invalida, perch  condotta come se avessimo un pi  alto grado di precisione (16 repliche) rispetto a quello che abbiamo effettivamente (una sorta di millantato credito!).

### Esempio 3

In questo caso abbiamo un disegno fattoriale con due livelli a blocchi randomizzati. Nel principio, questo disegno non ha nulla di diverso da quello relativo all'esempio 1, fatto salvo un minor numero di trattamenti (solo 6). Anche in questo caso, ci facciamo aiutare da R.

```
trt <- c(3,2) # factorial 3x2
design2way <- design.ab(trt, r=4, serie=2, design="rcbd", seed=777)
book <- design2way$book
levels(book$A) <- c("PROF", "SUP", "MIN")
```



```
levels(book$B) <- c("TOT", "PARZ")
book
```

```
##   plots block   A   B
## 1   101     1 SUP PARZ
## 2   102     1 PROF PARZ
## 3   103     1 PROF TOT
## 4   104     1 MIN TOT
## 5   105     1 SUP TOT
## 6   106     1 MIN PARZ
## 7   107     2 MIN TOT
## 8   108     2 SUP TOT
## 9   109     2 MIN PARZ
## 10  110     2 PROF TOT
## 11  111     2 SUP PARZ
## 12  112     2 PROF PARZ
## 13  113     3 MIN TOT
## 14  114     3 SUP TOT
## 15  115     3 PROF PARZ
## 16  116     3 MIN PARZ
## 17  117     3 SUP PARZ
## 18  118     3 PROF TOT
## 19  119     4 MIN PARZ
## 20  120     4 PROF TOT
## 21  121     4 PROF PARZ
## 22  122     4 MIN TOT
## 23  123     4 SUP TOT
## 24  124     4 SUP PARZ
```

La mappa risultante visibile pi sotto.

Questo disegno totalmente appropriato, ma ci costringe a lasciare parecchio spazio tra una parcella e l'altra, per poter manovrare con la macchina per la lavorazione del terreno. Sarebbe utile raggruppare le parcelle caratterizzate dalla stessa lavorazione, in modo da poter lavorare su superfici pi ampie. Ne guadagnerebbe l'uniformit dell'esperimento e l'accuratezza dei risultati. Possiamo quindi immaginare un disegno a un fattore, con parcelle di dimensione doppia (**main-plots**), sulle quali eseguire, in modo randomizzato le lavorazioni del terreno. Successivamente, ogni main-plot pu essere suddivisa in due e, su ognuna delle due met, possono essere allocati in modo random i due trattamenti di diserbo. In questo modo ci troviamo ad operare

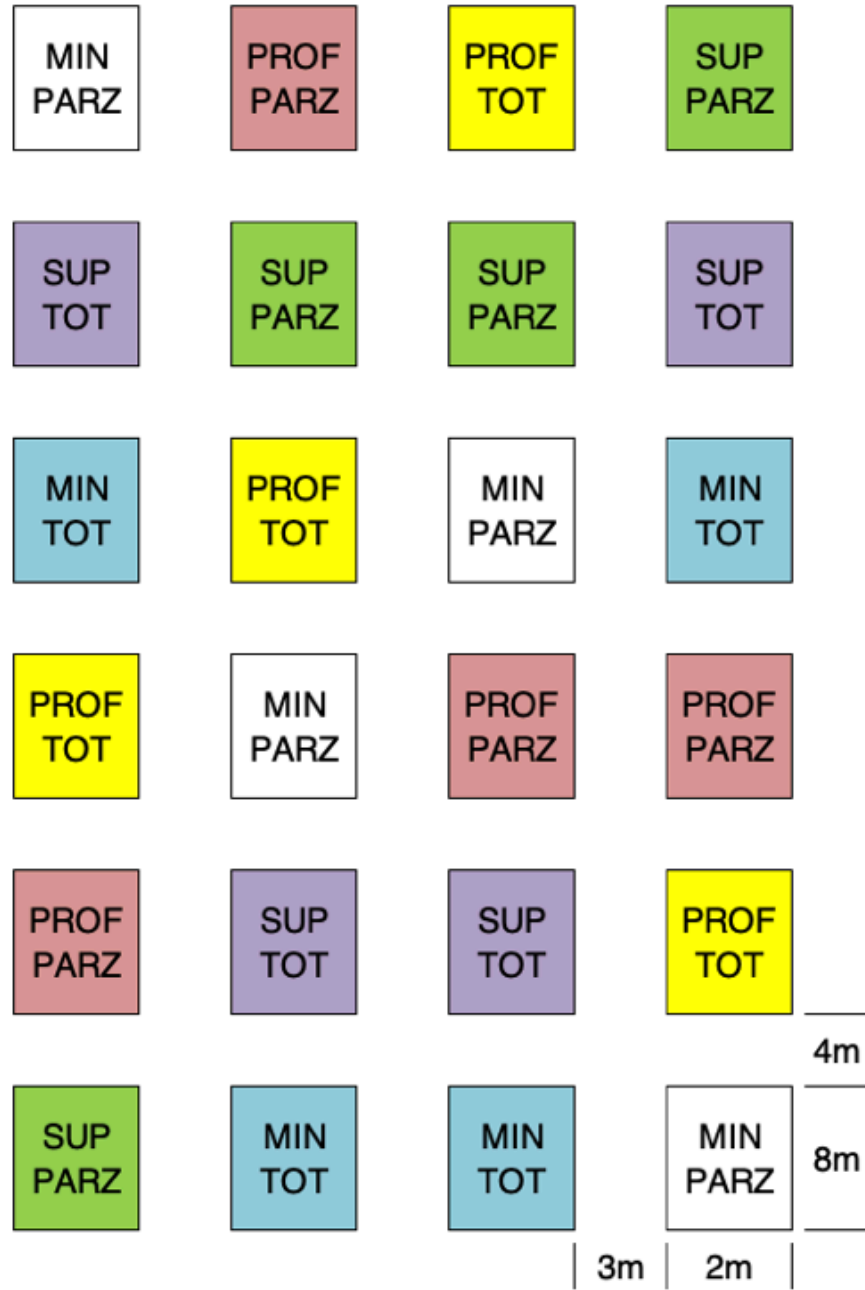


Figura 3.10: Schema sperimentale fattoriale a blocchi randomizzati per l'Esempio 3

con parcelle di due dimensioni diverse: le main-plots per le lavorazioni e le sub-plots per il diserbo. Questo tipo di schema prende il nome di **parcella suddivisa** (**split-plot**), ed è piuttosto comune nella sperimentazione di pieno campo.

Proviamo ad utilizzare R per redigere il piano sperimentale.

```
lavorazione <- c("PROF", "SUP", "MIN")
diserbo <- c("TOT", "PARZ")
designSPLIT <- design.split(lavorazione, diserbo, r=4, serie=2, seed=777)
book <- designSPLIT$book
book
```

##	plots	splots	block	lavorazione	diserbo
## 1	101	1	1	SUP	PARZ
## 2	101	2	1	SUP	TOT
## 3	102	1	1	PROF	TOT
## 4	102	2	1	PROF	PARZ
## 5	103	1	1	MIN	PARZ
## 6	103	2	1	MIN	TOT
## 7	104	1	2	SUP	PARZ
## 8	104	2	2	SUP	TOT
## 9	105	1	2	MIN	TOT
## 10	105	2	2	MIN	PARZ
## 11	106	1	2	PROF	TOT
## 12	106	2	2	PROF	PARZ
## 13	107	1	3	MIN	TOT
## 14	107	2	3	MIN	PARZ
## 15	108	1	3	SUP	TOT
## 16	108	2	3	SUP	PARZ
## 17	109	1	3	PROF	TOT
## 18	109	2	3	PROF	PARZ
## 19	110	1	4	PROF	PARZ
## 20	110	2	4	PROF	TOT
## 21	111	1	4	MIN	TOT
## 22	111	2	4	MIN	PARZ
## 23	112	1	4	SUP	PARZ
## 24	112	2	4	SUP	TOT

In alcune circostanze, soprattutto nelle prove di diserbo chimico, potrebbe trovare applicazione un altro tipo di schema sperimentale, nel quale, in ogni blocco, un trattamento viene applicato a tutte le parcelle di una riga e l'altro

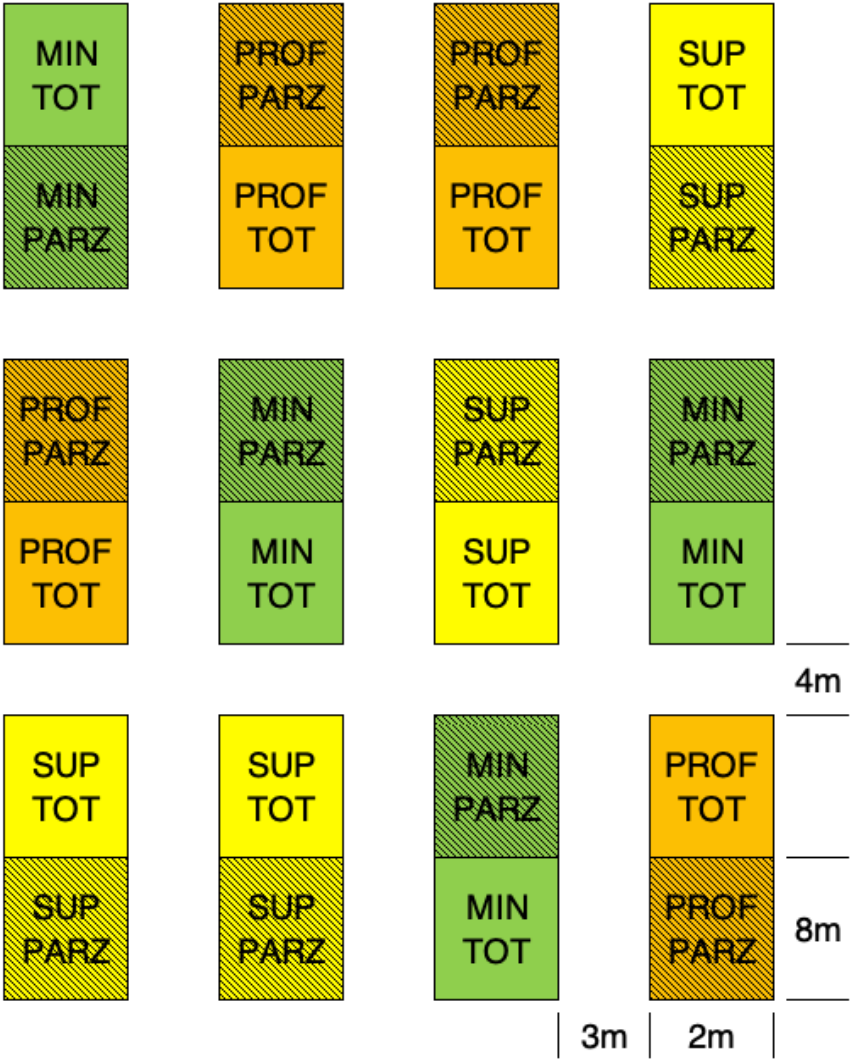


Figura 3.11: Schema sperimentale split-plot a blocchi randomizzati per l'Esempio 3

Rimsulfuron Colza	Testimone Colza	Testimone Barbabietola	Rimsulfuron Barbabietola	Testimone Girasole	Rimsulfuron Girasole
Rimsulfuron Girasole	Testimone Girasole	Testimone Colza	Rimsulfuron Colza	Testimone Barbabietola	Rimsulfuron Barbabietola
Rimsulfuron Barbabietola	Testimone Barbabietola	Testimone Girasole	Rimsulfuron Girasole	Testimone Colza	Rimsulfuron Colza

Figura 3.12: Schema sperimentale strip-plot

trattamento a tutte le parcelle di una colonna. Ad esempio, il disegno sottostante mostra una prova nella quale il terreno stato diserbato in una striscia nel senso della lunghezza e, dopo il diserbo, le colture sono state seminate in striscia, nel senso della larghezza. Questo disegno detto **strip-plot** ed molto comodo perch consente di lavorare velocemente.

#### Esempio 4

La prova di erba medica fondamentalemente un esperimento a blocchi randomizzati, il cui piano riportato pi sotto. Tuttavia, si tratta di una coltura poiliennale nella quale ripeteremo le misurazioni ogni anno sulle stesse parcelle. le misure ripetute non sono randomizzate (non possono esserlo), ma seguono una metrica temporale. Proprio per questo sviluppo lungo la scala del tempo, i dati che si raccolgono in questi esperimenti a misure ripetute sono detti **dati longitudinali**. Guardando bene il disegno si capisce anche per si parla di **split-plot nel tempo**. Esempi affini sono relativi all’analisi di accrescimento con misure non distruttive (esempio l’altezza) oppure i prelievi di terreno a profondit diverse, anche se, in quest’ultimo caso, la metrica delle misure ripetute spaziale, non temporale.

Si pu notare una certa analogia con il sottocampionamento illstrato pi sopra, nel senso che vengono prese pi misure per parcella. Tuttavia, bisogna tener presente che nel sottocampionamento le diverse misure sono solo repliche e non vi nessuna esigenza di distinguere tra quelle prese nella stessa parcella. Invece, nel caso delle misure ripetute ognuna di esse ha interesse individuale, in quanto espressione di un’anno particolare.

#### Esempio 5

Per questo disegno osservazionale, la mappa non necessaria. Tuttavia, si pu notare che, in ogni supermercato, abbiamo un disegno a randomizzazione



completa, con tre tipi di confezioni e tre repliche, cio nove confezioni scelte a random da un lotto pi grande. Insomma, si tratta di un esperimento ripetuto 9 volte che, pertanto, ha una certa affinit con l'esperimento ripetuto dell'Esempio 2.

### 3.3.13 Impianto delle prove

Da questo punto in poi, subentrano le competenze agronomiche e fitopatologiche necessarie per codurre gli esperimenti, Mi piace solo ricordare alcune pratiche usuali nella sperimentazione di pieno campo, destinate a migliorare l'efficienza della prova.

1. Seminare a densit pi alte e poi diradare, per assicurare una migliore uniformit di impianto
2. Prelevare da ogni parcella pi campioni ed, eventualmente, omogeneizzarli o mediare i risultati ottenuti (vedi il caso dei 1000 semi)
3. Considerare le caratteristiche naturalmente meno variabili (es. la produzione areica e non la produzione per pianta)

Voglio inoltre ricordare che gli esperimenti parcellari configurano una situazione nella quale, per l'elevata cura che si pone nelle tecniche agronomiche, si riesce ad ottenere una produttivit almeno del 20% superiore rispetto a quanto avviene nella normale pratica agricola.

## 3.4 Come scrivere un progetto di ricerca o un report di ricerca

Quanto abbiamo finora esposto costituisce uno schema generale che pu essere adottato per redigere un progetto di ricerca o un report sui risultati ottenuti (tesi, pubblicazione). Bisogna provare che la ricerca che si eseguita precisa, accurata e replicabile/riproducibile e, di conseguenza, i risultati sono validi.

Nella redazione di un progetto di ricerca o di un report, fondamentale tratteggiare bene i seguenti elementi:

1. Titolo della ricerca
2. Descrizione del problema e background scientifico
3. Ipotesi scientifica, motivazioni e obiettivi
4. Tipo di esperimento e durata

5. Disegno sperimentale: trattamenti sperimentali (tesi) a confronto con dettagli relativi all'applicazione
6. Unit sperimentali e criteri per la loro selezione. Dettagli su repliche e randomizzazione
7. Dettagli su eventuali tecniche di 'blocking'
8. Variabili da rilevare/rilevate
9. Dettagli su come le variabili saranno/sono state rilevate
10. Esposizione dei risultati (solo report)
11. Discussione (solo report)
12. Conclusioni (solo report)

Alcuni aspetti che divengono elemento di valutazione del progetto e/o del report sono i seguenti:

1. La selezione dei metodi deve essere coerente con gli obiettivi
2. Descrizione dettagliata dei materiali e metodi (bisogna che chiunque sia in grado di replicare l'esperimento)
3. Esposizione dei risultati chiara e convincente
4. Discussione approfondita e con molti riferimenti alla letteratura.

### 3.5 Per approfondimenti

1. Hurlbert, S., 1984. Pseudoreplication and the design of ecological experiments. *Ecological Monographs*, 54, 187-211
2. Kuehl, R. O., 2000. Design of experiments: statistical principles of research design and analysis. Duxbury Press (CHAPTER 1)
3. LeClerg, E.; Leonard, W. & Clark, A., 1962. Field Plot Technique. Burgess Publishing Company, (CHAPTER 3)
4. Felipe de Mendiburu (2017). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package, version 1.2-8. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>



# Capitolo 4

## Methods

We describe our methods in this chapter.

# Capitolo 5

## Applications

Some *significant* applications are demonstrated in this chapter.

### 5.1 Example one

### 5.2 Example two

# Capitolo 6

## Final Words

We have finished a nice book.

## References