

# Metodologia sperimentale per le scienze agrarie

Andrea Onofri e Dario Sacco

Update: v. 0.8 (14/12/19), compil. 2019-12-14

# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>9</b>
Organizzazione del testo . . . . .	9
Gli autori . . . . .	9
Pre-requisiti . . . . .	9
Packages aggiuntivi . . . . .	9
<b>1 Scienza e pseudo-scienza</b>	<b>10</b>
1.0.1 Cosa è quindi una prova scientifica? . . . . .	11
1.1 Esperimenti buoni e cattivi! . . . . .	11
1.1.1 L'errore sperimentale . . . . .	12
1.1.2 Il campionamento . . . . .	13
1.2 Scienza = metodo . . . . .	14
1.3 Chi valuta se un esperimento è attendibile? . . . . .	16
1.4 Il metodo sperimentale . . . . .	17
1.5 Metodi sperimentali validi ed invalidi . . . . .	17
1.5.1 Primo esperimento . . . . .	18
1.5.2 Secondo esperimento . . . . .	18
1.5.3 Terzo esperimento . . . . .	19
1.5.4 Quarto esperimento: quello buono . . . . .	19
1.6 Incertezza residua . . . . .	19
1.7 Il ruolo della statistica . . . . .	20
1.8 Conclusioni . . . . .	20
<b>2 Esperimenti validi ed invalidi</b>	<b>22</b>
2.1 Definizioni . . . . .	22
2.2 Elementi fondamentali del disegno sperimentale . . . . .	23
2.2.1 Primo elemento: controllo degli errori . . . . .	24
2.2.2 Secondo elemento: replicazione . . . . .	28
2.2.3 Terzo elemento: randomizzazione . . . . .	29
2.2.4 Esperimenti non validi . . . . .	31

2.3	Conclusione . . . . .	36
2.4	Per approfondire un po'... . . . .	36
<b>3</b>	<b>Progettare un esperimento</b>	<b>38</b>
3.1	Ipotesi scientifica → obiettivo dell'esperimento . . . . .	38
3.2	Identificazione dei fattori sperimentali . . . . .	39
3.2.1	Esperimenti (multi)fattoriali . . . . .	39
3.2.2	Aggiungere un controllo? . . . . .	40
3.2.3	Fattori sperimentali di trattamento e di blocco . . . . .	40
3.3	Identificazione delle unità sperimentali . . . . .	41
3.3.1	Cornice di campionamento . . . . .	41
3.3.2	Scelta delle unità sperimentali . . . . .	41
3.3.3	Unità sperimentali in campo: le parcelle . . . . .	42
3.4	Allocazione dei trattamenti e disegno sperimentale . . . . .	43
3.4.1	Disegni completamente randomizzati . . . . .	45
3.4.2	Disegni a blocchi randomizzati . . . . .	45
3.4.3	Disegni a quadrato latino . . . . .	48
3.5	Scelta delle variabili da rilevare . . . . .	49
3.5.1	Variabili nominali (categoriche) . . . . .	50
3.5.2	Variabili ordinali . . . . .	50
3.5.3	Variabili quantitative discrete . . . . .	50
3.5.4	Variabili quantitative continue . . . . .	51
3.5.5	Rilievi visivi e sensoriali . . . . .	51
3.5.6	Variabili di confondimento . . . . .	52
3.6	Impianto delle prove . . . . .	52
3.7	Scrivere un progetto/report di ricerca: semplici indicazioni . . . . .	53
3.8	Per approfondire un po'... . . . .	54
<b>4</b>	<b>Modelli matematici ed analisi dei dati</b>	<b>55</b>
4.1	Verità 'vera' e modelli deterministici . . . . .	56
4.1.1	Qualche esempio di modello deterministico . . . . .	57
4.2	Genesi deterministica delle osservazioni sperimentali . . . . .	58
4.3	Errore sperimentale e modelli stocastici . . . . .	59
4.3.1	Funzioni di probabilità . . . . .	60
4.3.2	Funzioni di densità . . . . .	62
4.4	La distribuzione normale (curva di Gauss) . . . . .	63
4.5	Modelli 'a due facce' . . . . .	64
4.6	E allora? . . . . .	67
4.7	Le simulazioni Monte Carlo . . . . .	67
4.8	Analisi dei dati e 'model fitting' . . . . .	68
4.9	Per approfondire un po'... . . . .	69

4.9.1	Generazione dei dati sperimentali: un esempio più realistico . . . . .	69
4.9.2	Modelli stocastici non-normali . . . . .	71
4.9.3	Altre letture . . . . .	75
<b>5</b>	<b>Stime ed incertezza</b>	<b>76</b>
5.1	L'analisi dei dati: gli 'ingredienti' fondamentali . . . . .	77
5.2	Esempio: una soluzione erbicida . . . . .	77
5.2.1	Il modello dei dati . . . . .	78
5.2.2	Analisi dei dati: stima dei parametri . . . . .	79
5.2.3	La 'sampling distribution' . . . . .	79
5.2.4	L'errore standard . . . . .	81
5.3	Riepilogo 1: Caratterizzare l'incertezza di un esperimento . . . . .	82
5.4	L'intervallo di confidenza . . . . .	82
5.5	Qual è il senso dell'intervallo di confidenza? . . . . .	84
5.6	Come presentare i risultati degli esperimenti . . . . .	85
5.7	Alcune precisazioni . . . . .	85
5.7.1	Campioni numerosi e non . . . . .	85
5.7.2	Popolazioni gaussiane e non . . . . .	86
5.8	Analisi statistica dei dati: riassunto del percorso logico . . . . .	86
5.9	Da ricordare . . . . .	87
5.10	Esercizi . . . . .	87
5.11	Per approfondire un po'... . . . .	88
5.12	Coverage degli intervalli di confidenza . . . . .	88
5.12.1	Intervalli di confidenza per fenomeni non-normali . . . . .	92
5.12.2	Altre letture . . . . .	96
<b>6</b>	<b>Decisioni e incertezza</b>	<b>97</b>
6.1	Confronto tra una media osservata e una media teorica . . . . .	97
6.1.1	Simulazione Monte Carlo . . . . .	99
6.1.2	Soluzione formale . . . . .	100
6.1.3	Interpretazione del P-level . . . . .	102
6.2	Confronto tra due medie: il test t di Student . . . . .	102
6.3	Confronto tra due proporzioni: il test $\chi^2$ . . . . .	107
6.4	Conclusioni . . . . .	109
6.5	Riepilogo . . . . .	109
6.6	Esercizi . . . . .	110
6.7	Per approfondire un po'... . . . .	110
6.7.1	Tipologie alternative di test t di Student . . . . .	110
6.7.2	Simulazione del P-value nel test d'ipotesi . . . . .	113
6.7.3	Altre letture . . . . .	115

<b>7</b>	<b>Modelli ANOVA ad una via</b>	<b>116</b>
7.1	Caso-studio: confronto tra erbicidi in vaso . . . . .	117
7.2	Descrizione del dataset . . . . .	118
7.3	Definizione di un modello lineare . . . . .	118
7.4	Parametrizzazione del modello . . . . .	119
7.4.1	Vincolo sul trattamento . . . . .	119
7.4.2	Vincolo sulla somma . . . . .	120
7.5	Assunzioni di base . . . . .	121
7.6	Stima dei parametri . . . . .	121
7.6.1	Coefficienti del modello . . . . .	121
7.6.2	Residui . . . . .	122
7.6.3	Stima di $\sigma$ . . . . .	122
7.6.4	SEM e SED . . . . .	123
7.7	Scomposizione della varianza . . . . .	124
7.8	Test d'ipotesi . . . . .	125
7.9	Operazioni con R . . . . .	128
7.10	Medie marginali attese . . . . .	130
7.11	Per concludere ... . . . .	130
7.12	Per approfondire un po'... . . . .	131
7.12.1	Simulazione della <i>sampling distribution</i> per F . . . . .	131
7.12.2	Altre letture . . . . .	131
<b>8</b>	<b>La verifica delle assunzioni di base</b>	<b>132</b>
8.1	Procedure diagnostiche . . . . .	133
8.2	Analisi grafica dei residui . . . . .	133
8.2.1	Grafico dei residui contro i valori attesi . . . . .	133
8.2.2	QQ-plot . . . . .	135
8.3	Strumenti diagnostici formali . . . . .	139
8.4	Risultati contraddittori . . . . .	141
8.5	'Terapia' . . . . .	141
8.5.1	Correzione/Rimozione degli outliers . . . . .	141
8.5.2	Correzione del modello . . . . .	142
8.5.3	Trasformazione della variabile indipendente . . . . .	142
8.5.4	Impiego di metodiche statistiche avanzate . . . . .	142
8.5.5	Trasformazioni stabilizzanti . . . . .	143
8.6	Esempio . . . . .	144
8.7	Per approfondire un po' ... . . . .	148
<b>9</b>	<b>Contrasti e confronti multipli</b>	<b>150</b>
9.1	Esempio . . . . .	151
9.2	I contrasti . . . . .	152

9.2.1	Varianza del contrasto e test d'ipotesi . . . . .	153
9.2.2	I contrasti con R . . . . .	154
9.3	I confronti multipli a coppie (pairwise comparisons) . . . . .	155
9.4	Display a lettere . . . . .	157
9.5	Problemi di molteplicità: tassi di errore per confronto e per esperimento . . . . .	158
9.5.1	Correzione per la molteplicità . . . . .	158
9.6	E le classiche procedure di confronto multiplo? . . . . .	160
9.7	Consigli pratici . . . . .	160
9.8	Per approfondire un po'... . . . .	161
9.8.1	Intervallo di confidenza di un contrasto . . . . .	161
9.8.2	Correzione per la molteplicità: qualche dettaglio ulteriore	162
9.8.3	Altre letture . . . . .	168
<b>10</b>	<b>Modelli ANOVA con fattori di blocco</b>	<b>170</b>
10.1	Caso-studio: confronto tra erbicidi in campo . . . . .	170
10.2	Definizione di un modello lineare . . . . .	171
10.3	Stima dei parametri . . . . .	172
10.3.1	Coefficienti del modello . . . . .	172
10.3.2	Residui e devianze . . . . .	174
10.4	Scomposizione della varianza . . . . .	175
10.5	Disegni a quadrato latino . . . . .	178
10.6	Caso studio: confronto tra metodi costruttivi . . . . .	178
10.7	Definizione di un modello lineare . . . . .	179
<b>11</b>	<b>Modelli ANOVA a due vie</b>	<b>181</b>
11.1	Il concetto di 'interazione' . . . . .	181
11.2	Tipi di interazione . . . . .	182
11.3	Caso-studio: interazione tra lavorazioni e diserbo chimico . . .	183
11.4	Definizione del modello lineare . . . . .	184
11.5	Stima dei parametri . . . . .	185
11.6	Verifica delle assunzioni di base . . . . .	187
11.7	Scomposizione delle varianze . . . . .	188
11.8	Medie marginali attese . . . . .	189
11.9	Calcolo degli errori standard (SEM e SED) . . . . .	190
11.10	Medie marginali attese e confronti multipli con R . . . . .	191
11.11	Per approfondire un po'.... . . . .	193
11.11.1	Anova a due vie: scomposizione 'manuale' della varianza	193
<b>12</b>	<b>La regressione lineare semplice</b>	<b>197</b>
12.1	Caso studio: effetto della concimazione azotata al frumento . .	197

12.2	Analisi preliminari . . . . .	198
12.3	Definizione del modello lineare . . . . .	200
12.4	Stima dei parametri . . . . .	200
12.5	Valutazione della bontà del modello . . . . .	202
12.5.1	Valutazione grafica . . . . .	202
12.5.2	Errori standard dei parametri . . . . .	202
12.5.3	Test F per la mancanza d'adattamento . . . . .	203
12.5.4	Test F per la bontà di adattamento e coefficiente di determinazione . . . . .	205
12.6	Previsioni . . . . .	206
12.7	Per approfondire un po'... . . . .	207
<b>13</b>	<b>La regressione non-lineare</b>	<b>208</b>
13.1	Caso studio: degradazione di un erbicida nel terreno . . . . .	208
13.2	Scelta della funzione . . . . .	210
13.3	Stima dei parametri . . . . .	211
13.3.1	Linearizzazione della funzione . . . . .	211
13.3.2	Approssimazione della vera funzione tramite una poli- nomiale in X . . . . .	213
13.3.3	Minimi quadrati non-lineari . . . . .	214
13.4	La regressione non-lineare con R . . . . .	214
13.5	Verifica della bontà del modello . . . . .	215
13.5.1	Analisi grafica dei residui . . . . .	215
13.5.2	Test F per la mancanza di adattamento (approssimato)	216
13.5.3	Errori standard dei parametri . . . . .	219
13.5.4	Coefficienti di determinazione . . . . .	219
13.6	Funzioni lineari e nonlineari dei parametri . . . . .	220
13.7	Previsioni . . . . .	221
13.8	Gestione delle situazioni 'patologiche' . . . . .	222
13.8.1	Trasformazione del modello . . . . .	223
13.8.2	Trasformazione dei dati . . . . .	223
13.9	Per approfondire un po'... . . . .	225
13.9.1	Riparametrizzazione delle funzioni non-lineari . . . . .	225
13.9.2	Altre letture . . . . .	229
<b>14</b>	<b>Appendice 1: breve introduzione ad R</b>	<b>230</b>
	Cosa è R? . . . . .	230
	Oggetti e assegnazioni . . . . .	231
	Costanti e vettori . . . . .	231
	Matrici . . . . .	232
	Dataframe . . . . .	232

Quale oggetto sto utilizzando? . . . . .	233
Operazioni ed operatori . . . . .	234
Funzioni ed argomenti . . . . .	234
Consigli per l'immissione di dati sperimentali . . . . .	235
Immissione manuale di dati . . . . .	235
Immissione di numeri progressivi . . . . .	236
Immissione dei codici delle tesi e dei blocchi . . . . .	236
Leggere e salvare dati esterni . . . . .	237
Alcune operazioni comuni sul dataset . . . . .	239
Selezionare un subset di dati . . . . .	239
Ordinare un vettore o un dataframe . . . . .	240
Workspace . . . . .	240
Script o programmi . . . . .	241
Interrogazione di oggetti . . . . .	242
Altre funzioni matriciali . . . . .	243
Cenni sulle funzionalità grafiche in R . . . . .	244
14.1 Per approfondire un po'... . . . .	247
<b>15 Appendice 2: Richiami di statistica descrittiva</b>	<b>249</b>
Dati quantitativi: analisi chimiche e altre misurazioni fondamentali	249
Indicatori di tendenza centrale . . . . .	250
Indicatori di dispersione . . . . .	250
Arrotondamenti . . . . .	254
Descrizione dei sottogruppi . . . . .	254
15.0.1 Relazioni tra variabili quantitative: correlazione . . . . .	256
Dati qualitativi: conteggi e frequenze . . . . .	256
Distribuzioni di frequenze e classamento . . . . .	257
Statistiche descrittive per le distribuzioni di frequenze . . . . .	258
Distribuzioni di frequenza bivariate: le tabelle di contingenza . . . . .	259
Connessione . . . . .	260
Esercizi . . . . .	262
Esercizio 1 . . . . .	262
Esercizio 2 . . . . .	262
15.1 Per approfondire un po'... . . . .	262
<b>16 Appendice 3: Split-plot, split-block e altro</b>	<b>263</b>
16.1 Disegni a split-plot . . . . .	263
16.1.1 Il caso-studio . . . . .	264
16.1.2 Definizione del modello lineare . . . . .	266
16.1.3 La natura dell'effetto delle main-plots . . . . .	267
16.1.4 Scomposizione della varianza . . . . .	268



16.1.5	Il fitting con R . . . . .	269
	Medie e SEM . . . . .	270
16.1.6	SED e confronti multipli . . . . .	272
16.2	Disegni a split-block . . . . .	275
16.2.1	Definizione del modello lineare . . . . .	276
16.2.2	Scomposizione della varianza . . . . .	276
	SED e confronti multipli . . . . .	277
16.3	Disegni gerarchici . . . . .	278
16.3.1	Definizione di un modello lineare . . . . .	279
16.3.2	Stima dei parametri . . . . .	279
16.3.3	Scomposizione della varianza . . . . .	282
16.3.4	Medie e SEM . . . . .	284

# Introduzione

[Da fare]

## Organizzazione del testo

[Da fare]

## Gli autori

[Da fare]

## Pre-requisiti

[Da fare.] Elementi di statistica descrittiva. Conoscenze preliminari di R. Sono nelle appendici.

## Packages aggiuntivi

[Da fare]

# Capitolo 1

## Scienza e pseudo-scienza

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:

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)

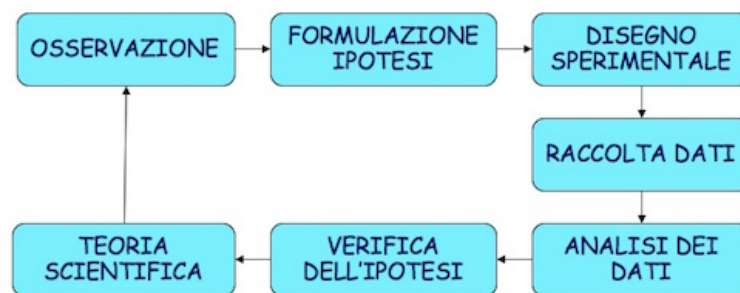


Figura 1.1: Il metodo scientifico Galileiano

### 1.0.1 Cosa è 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 che 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 (1911-1993), anche se pare che egli in realtà non l’abbia mai pronunciato.

## 1.1 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 affidabilità:

1. Errore sperimentale
2. Campionamento

Vediamo qualche dettaglio in più a proposito di questi due elementi.

### 1.1.1 L'errore sperimentale

Alla base della raccolta di dati sperimentali vi è un processo di **misurazione**, attraverso la quale il fenomeno oggetto di studio viene caratterizzato con appositi strumenti scientifici, più o meno complessi. Il problema è che nessuna misura può essere considerata precisa in senso assoluto, cioè perfettamente coincidente col valore reale della grandezza misurata, che è destinato a rimanere un'entità 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 è 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 è provocato da difetti intrinseci dello strumento o incapacità peculiari dell'operatore e tende a ripetersi costantemente in misure successive. Un esempio tipico è quello di una bilancia non tarata, che tende ad aggiungere 20 grammi ad ogni misura che effettuiamo. Per queste sue peculiarità, l'errore sistematico non è 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 comunità scientifica mondiale.

L'errore accidentale (o casuale) è 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 può capitare soprattutto ad un operatore che esegua moltissime misure manuali con procedure di routine;
3. *irregolarità 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: è facile che compaiano errori legati all'irregolarità del frutto o al fatto che l'operatore non riesce a

misurare lo stesso nel punto in cui il suo diametro è massimo. Oppure, più semplicemente si pensi alla misurazione della produzione di granella di una certa varietà di frumento: anche ipotizzando di avere uno strumento 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 variabilità del terreno agrario).

Dato che queste imprecisioni sono assolutamente casuali è 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 più volte. Di conseguenza, l'errore sperimentale casuale può 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.

### 1.1.2 Il campionamento

Se è 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 misure pari all'effettivo (reale) valore della grandezza da misurare, bisognerebbe effettuare infinite repliche. Tuttavia è altrettanto evidente che questo procedimento è totalmente improponibile!!!

Qual è 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, è evidente che ci troviamo di fronte solo ad un campione delle infinite misure che avremmo dovuto fare, ma che non abbiamo fatto. La domanda è: questo campione è 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 è tutt'altro che remota. Gli scienziati americani Pons e Fleischmann il 23 Marzo del 1989 diffusero pubbli-



Figura 1.2: Conseguenze di un esperimento sbagliato

camente 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.

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

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

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

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

Un elemento fondamentale di valutazione della bontà di un esperimento e dei dati da esso ottenuti sta nella cosiddetta **replicabilità**, cioè nella probabilità di ottenere risultati molto simili (se non uguali) replicando l'esperimento in condizioni analoghe. Per valutare se un esperimento è replicabile è 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 riproducibilità è da considerarsi valido.

E' chiaro comunque che ogni esperimento può essere smentito. Questo non è un problema: la scienza è 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 può anche non essere totale: ad esempio la teoria gravitazionale di Newton è ancora oggi valida per molte situazioni pratiche, anche se è stata abbandonata in favore della teoria della relatività, che spiega meglio il moto dei corpi ad altissime velocità.

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



### 1.3 Chi valuta se un esperimento è attendibile?

Quanto detto finora vorrebbe chiarire come il punto centrale della scienza non è la certezza delle teorie, bensì il metodo che viene utilizzato per definirle. Ognuno di noi è quindi responsabile di verificare che le informazioni in suo possesso siano ‘scientificamente’ attendibili, cioè ottenute con un metodo sperimentale adeguato. Il fatto è 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 è 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 è sufficientemente ‘forte’. Le eventuali critiche vengono presentate all’autore, che è tenuto a rispondere in modo convincente, anche ripetendo gli esperimenti se necessario. Il processo richiede spesso interi mesi ed è abbastanza impegnativo per uno scenziato. E’ piuttosto significativa l’immagine presentata in [scienceBlog.com](http://scienceBlog.com), che allego qui.

In sostanza il meccanismo di *peer review* è 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 è 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.

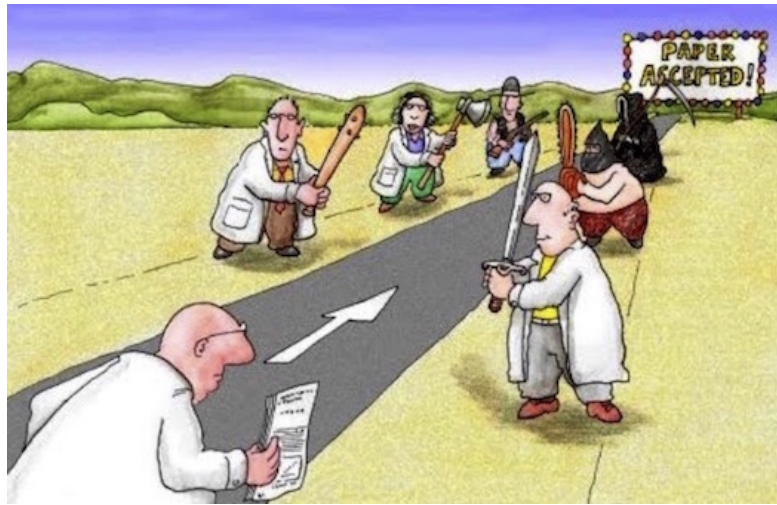


Figura 1.3: Il processo di peer review

## 1.4 Il metodo sperimentale

Almeno in ambito biologico, la definizione del metodo sperimentale è 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 variabilità, isolando quella oggetto di studio (controllo locale degli errori);
2. replicare le misure più volte (replicazione)
3. Scegliere le unità sperimentali da misurare in modo totalmente casuale, così 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.

## 1.5 Metodi sperimentali validi ed invalidi

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

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

### 1.5.1 Primo esperimento

Come ogni scienziato, 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. Ovviamente, se prova a pubblicare questa notizia, il suo lavoro verrà 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 varietà di mais impiegata? E' chiaro che questo non è un esperimento controllato: il campo trattato e quello non trattato (riferimento) differiscono per molte altre caratteristiche, oltre al fertilizzante impiegato.

### 1.5.2 Secondo esperimento

A questo punto il ricercatore pianifica un esperimento comparativo controllato: prende due campi di mais, vicini, con lo stesso terreno, semina la stessa varietà 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 è 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 è 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 è in grado di provare che il risultato è replicabile.

### 1.5.3 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, senza accorgersene, ha scelto i campi trattati con un criterio sistematico: procedendo da sinistra verso destra, ha trattato un campo ed ha lasciato non trattato quello immediatamente contiguo alla sua destra e così via. Di conseguenza, i campi trattati sono tutti a sinistra di quelli non trattati, il che 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, indipendentemente dall'effetto del concime. In presenza di questo 'ragionevole' dubbio, la prova non può avere valenza scientifica.

### 1.5.4 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 è 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 è controllato, replicato e randomizzato e il risultato ottenuto, in quanto ragionevolmente attendibile, può essere pubblicato.

## 1.6 Incertezza residua

Insomma, un esperimento valido è 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 (cioè ampliassimo il campione), queste potrebbero invalidare i risultati ottenuti fino a quel momento.

Se mi è concesso un paragone calcistico, è un po' come chiedersi come finirà una partita di calcio dopo aver assistito solo al primo tempo: in alcune circostanze, quando una delle due squadre ha mostrato una chiara superiorità, la previsione è 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 può essere sempre smentita alla prova dei fatti.

Anche la scienza funziona così. 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 più alte di quelle del non trattato e quindi possiamo concludere, con ragionevole certezza, che il fertilizzante è efficace. In altri casi, dove la produzione media del trattato fosse solo lievemente più alta del non trattato, l'esperimento potrebbe essere inconclusivo, cioè incapace di dare risultati attendibili sull'effettiva efficacia del nostro fertilizzante. Avremmo quindi bisogno di fare altre prove di conferma.

## 1.7 Il ruolo della statistica

Nell'ottica esposta in precedenza, 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 è l'obiettivo di questo corso.

## 1.8 Conclusioni

In conclusione, possiamo ripartire dalla domanda iniziale: “Che cosa è la scienza?”, per rispondere che è scienza tutto ciò che è 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.

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

## Capitolo 2

# Esperimenti validi ed invalidi

### 2.1 Definizioni

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

Ogni esperimento deve essere attentamente pianificato. Infatti, sappiamo che la variabilità esistente tra soggetti sperimentali, il campionamento, le irregolarità di misura e molti altri fattori perturbativi ci impediscono di osservare la realtà 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 o, anche peggio, dovuti a qualche elemento ignoto.

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 validità delle conclusioni raggiunte. Cerchiamo di chiarire cosa si intende con questi tre termini.

**Precisione.** Con il termine precisione intendiamo due cose: la prima è relativa al numero di decimali che ci fornisce il nostro strumento di misura. E' evidente, ad esempio, come un calibro sia più preciso di un metro da sarto. Oltre a questo concetto abbastanza intuitivo di precisione ce n'è un altro, specificatamente legato agli esperimenti scientifici, nei quali le misure vengono ripetute più volte. La precisione di un esperimento non è altro che la variabilità dei risultati tra una replica e l'altra.

**Accuratezza.** La precisione, da sola, non garantisce che l'esperimento sia affidabile. Abbiamo menzionato nel capitolo precedente che l'errore sperimentale può essere casuale o sistematico. Quest'ultimo può 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. L'accuratezza è proprio la capacità di un procedimento di misura di restituire il valore vero del soggetto misurato, anche se come media di un numero molto elevato di repliche. L'accuratezza è molto più importante della precisione: infatti una misura accurata, ma imprecisa, riflette bene la realtà, anche se in modo vago. Al contrario, una misura precisa, ma inaccurata ci porta completamente fuori strada, perchè non riflette la realtà! Un esperimento/risultato non accurato si dice 'distorto' (*biased*).

**Replicabilità/Riproducibilità.** Un esperimento o una misura sono replicabili se, quando ripetuti in condizioni assolutamente analoghe (stessi soggetti, ambiente, strumenti...), restituiscono risultati equivalenti. Alcuni biostatistici distinguono la replicabilità dalla riproducibilità, in quanto considerano quest'ultima come la possibilità di ottenere risultati equivalenti ripetendo una misura in condizioni diverse (diversi soggetti, diverso ambiente...). E' evidente che un esperimento può essere totalmente accurato e replicabile, ma non riproducibile con soggetti e condizioni ambientali diverse. Se è così, le conclusioni raggiunte, anche se accurate, non sono generalizzabili.

## 2.2 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 è "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.

Abbiamo già menzionato questi aspetti nel capitolo precedente; ora li riprendiamo in esame con maggior dettaglio.

### 2.2.1 Primo elemento: 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. Ad esempio, se dobbiamo confrontare due fitofarmaci, dobbiamo fare in modo che i soggetti inclusi nell'esperimento differiscano tra di loro solo per il fitofarmaco impiegato e non per altro.

Declinare questi principi richiederebbe una vita di esperienza! Vogliamo solo ricordare alcuni aspetti fondamentali, relativi all'importanza di:

1. Campionamento rappresentativo
2. Omogeneità
3. Rigore metodologico

## 4. Evitare le ‘intrusioni’

**Campionamento rappresentativo**

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

Cerchiamo subito di comprendere una fondamentale distinzione tra unità sperimentali e unità osservazionali. Le prime sono state definite nel paragrafo precedente; le seconde sono 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'unità sperimentale, le piante sono invece le unità osservazionali. L'elemento discriminante di questo esempio è l'indipendenza: mentre le unità sperimentali hanno ricevuto il trattamento in modo indipendente l'una dall'altra, le unità osservazionali no. Questa differenza è fondamentale, per motivi che vedremo più avanti.

Le unità sperimentali possono essere di varia natura (persone, semi, piante, animali...); nel caso degli esperimenti di campo, le unità sperimentali sono dette **parcelle** e sono un pezzetto di terreno, di varia forma e dimensione.

Le unità sperimentali sono scelte per campionamento, che è un elemento fondamentale dell'esperimento ed avviene all'interno della cosiddetta **cornice di campionamento**, cioè la popolazione da cui io devo campionare. Quest'ultima deve essere scelta in modo adeguato: devo effettuare un esperimento valido per l'Italia centrale, per una località 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? La **cornice di campionamento** è fondamentale in quanto il campione, se ben scelto, rappresenta la popolazione da cui deriva, non altre.

E' superfluo dire che, nell'ambito della cornice di campionamento, il campione deve essere prescelto in modo da essere rappresentativo, altrimenti l'esperimento è invalido. Dare indicazioni su come si possa assicurare la rappresentatività del campione è impossibile, in quanto ciò dipende dalla tipologia di esperimento. Il campionamento è fondamentale nelle scienze sociali, dove vengono applicate tecniche particolari, come il campionamento randomizzato (completamente casuale), quello stratificato (che avviene all'interno di strati

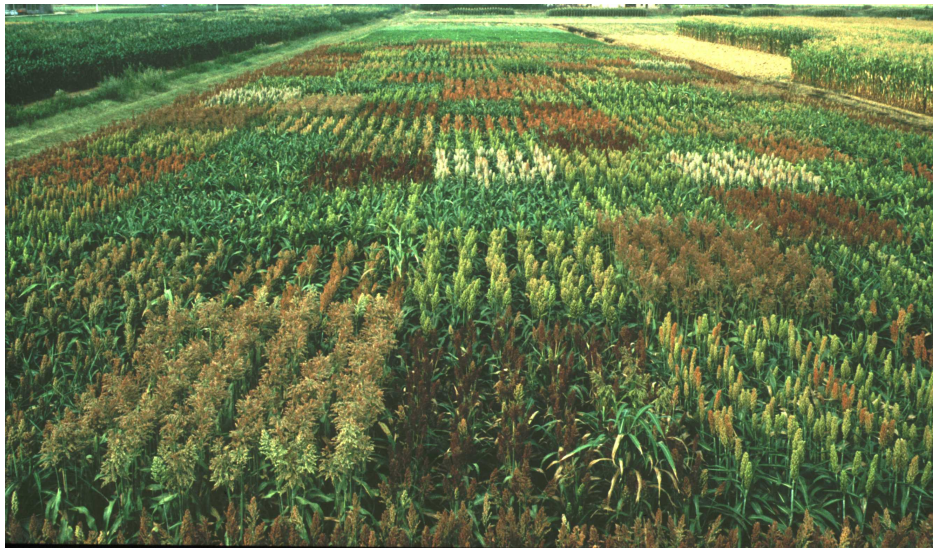


Figura 2.1: Una prova sperimentale in campo (Foto D. Alberati)

omogenei della popolazione), quello sistematico (es. prendo il primo soggetto che incontro e poi ne prendo uno ogni dieci), ecc.. Chi fosse interessato può reperire informazioni nei testi indicati in fondo al capitolo.

Nelle scienze agrarie e biologiche, il campionamento si giova di metodologie meno ‘raffinate’ e spesso si prendono i soli soggetti disponibili (le parcelle di un campo sperimentale o gli animali della stalla del Dipartimento in cui si opera...). E’ chiaro che, pur non eseguendo una vera e propria operazione di campionamento, non bisogna scordare che i soggetti sperimentali rappresentano solo la popolazione da cui sono stati estratti. Ad esempio, se faccio un esperimento in un’azienda sperimentale del centro Italia, i risultati che ottengo sono riferibili solo a questa zona geografica; se volessi conclusioni più generali dovrei cercare anche altre aziende in situazioni pedo-climatiche diverse.

### **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 è 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; né più, né meno.

### Rigore

Direi che questo aspetto è 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 sarà necessario attenersi scrupolosamente a metodi validati e largamente condivisi.

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

### Evitare le 'intrusioni demoniache'

Secondo Hurlbert (1984), le intrusioni sono eventi totalmente casuali che impattano negativamente con un esperimento in corso. E' 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 è questo: uno sperimentatore vuole studiare l'entità della predazione dovuta alle volpi e quindi usa campi senza staccionate (dove le volpi possono entrare) e campi protetti da staccionate (e quindi liberi da volpi). Se le staccionate, 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.

## 2.2.2 Secondo elemento: replicazione

In ogni esperimento, i trattamenti dovrebbe essere replicati su due o più unità sperimentali. Ciò 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 provocato risultati distorti
3. misurare l'errore sperimentale, come variabilità di risposta tra repliche trattate nello stesso modo (precisione dell'esperimento)
4. incrementare la precisione dell'esperimento (più sono le repliche più l'esperimento è preciso, perché si migliora la stima della caratteristica misurata, diminuendo l'incertezza)

Per poter essere utili, le repliche debbono essere indipendenti, cioè 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 è fondamentale, perché in ogni parte del processo di trattamento possono nascondersi errori più o meno grandi, che possono essere riconosciuti solo se colpiscono in modo casuale le unità sperimentali. Se la manipolazione è, anche solo in parte, comune, questi errori colpiscono tutte le repliche allo stesso modo, diventano sistematici e quindi non più 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: più sono e meglio è, anche se è necessario trovare un equilibrio accettabile tra precisione e costo dell'esperimento. Nella sperimentazione di campo, due repliche sono poche, tre appena sufficienti, quattro costituiscono la situazione più comune, mentre un numero maggiore di repliche è abbastanza raro, non solo per la difficoltà di seguire l'esperimento, ma anche perché aumentano la dimensione della prova e, di conseguenza, la variabilità del terreno.

### 2.2.3 Terzo elemento: 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 unità sperimentali trattate nello stesso modo, così da confondersi con l'effetto del trattamento. Un esempio banale è che potremmo somministrare un farmaco a quattro soggetti in modo totalmente indipendente, ma se i quattro soggetti fossero sistematicamente più 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 più danneggiate delle altre unità 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 più insignificanti. La randomizzazione è 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 unità sperimentali. Gli esperimenti che prevedono l'allocazione del trattamento sono detti 'manipolativi' o 'disegnati'.
2. A volte l'allocazione del trattamento non è possibile o non è 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 è legata alla scelta casuale di soggetti che sono 'naturalmente' trattati. Esperimenti di questi tipo, si dicono **osservazionali**. Un esempio è la valutazione dell'effetto dell'inquinamento con metalli pesanti nella salute degli animali: ovviamente non è 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 perché 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 sì che tutti i soggetti abbiano la stessa probabilità di ricevere qualunque trattamento oppure qualunque intrusione casuale. In questo modo, la probabilità 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 variabilità 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, perché non pone dubbi fondati di inaccuratezza. Tuttavia, in alcune circostanze è possibile porre restrizioni (vincoli) alla randomizzazione, perché ciò porta ad un esperimento più preciso.

In particolare, le unità sperimentali possono presentare delle differenze, ad esempio di fertilità, oppure di sesso. Ad esempio, randomizzare completamente l'allocazione dei trattamenti potrebbe far sì che tra le repliche di un trattamento vi siano più 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 più 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, cioè in una situazione di maggiore omogeneità.

Il raggruppamento delle unità sperimentali può tener conto di:

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

A volte si possono anche avere situazioni in cui abbiamo soggetti raggruppati per due caratteristiche o più; ad esempio potremmo avere quattro classi di età e quattro di peso: ogni trattamento deve essere applicato ad ogni combinazione peso ed età (età1 + peso1, età2 + peso2, età3 + peso3 ed età4 + peso4). In questo modo riusciamo a diminuire ulteriormente la variabilità non spiegata e, pertanto, ad aumentare la precisione dell'esperimento.

Chiaramente, randomizzare all'interno del gruppo invece che randomizzare completamente crea un vincolo. 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')

### **2.2.4 Esperimenti non validi**

A questo punto dovrebbero essere chiare le caratteristiche di un esperimento valido. A completamento, cerchiamo di elencare alcune 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 è 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 è 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 è 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 è 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 è piuttosto temuta la cosiddetta 'correlazione 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

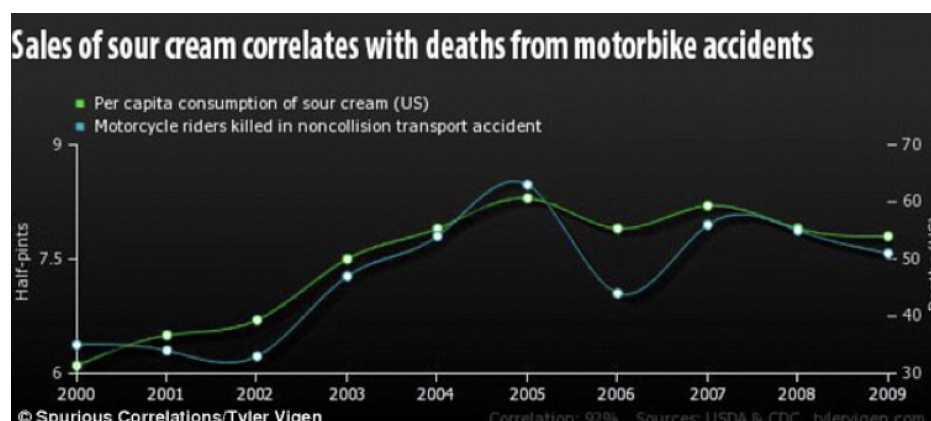


Figura 2.2: Esempio di correlazione spuria

in motocicletta. Chiaramente, non esistono spiegazioni scientifiche per questo effetto, che è, ovviamente, del tutto casuale. Il problema è che questa correlazione spuria non è sempre così semplice da rintracciare.

A volte il confounding non è casuale, ma è 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, è utilissima la classificazione fatta da Hurlbert (1984), che riportiamo di seguito.

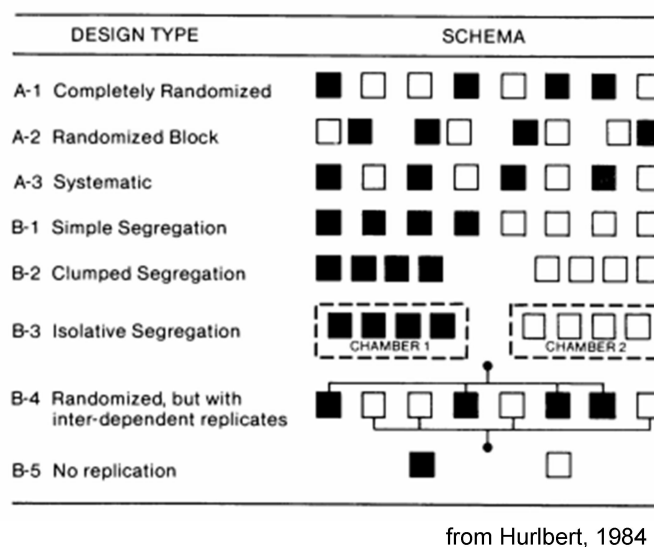


Figura 2.3: Indicazioni per una corretta randomizzazione (Hurlbert, 1984)

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

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

Il disegno A3 è quantomeno 'sospetto': vi sono repliche vere, ma l'allocatione dei trattamenti non è randomizzata ed avviene con un processo sistematico per il quale 'nero' e 'bianco' si alternano. Cosa succederebbe se vi fosse un gradiente di fertilità decrescente da destra verso sinistra? Le unità 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: è 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, giacché un'epoca precede sempre l'altra.
3. Dobbiamo confrontare la presenza di residui di un fitofarmaco a due profondità e non possiamo randomizzare, perché una profondità 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 è usualmente invalido: non vi è randomizzazione e ciò massimizza i problemi del disegno A3: la separazione delle unità sperimentali 'bianche' e 'nere' non consente una valutazione adeguata dell'effetto del trattamento, che è confuso con ogni potenziale differenza tra la parte destra e la sinistra dell'ambiente in cui la sperimentazione viene eseguita. Ovviamente, la separazione può essere non solo spaziale, ma anche temporale. Anche in questo caso diamo alcuni esempi in cui una situazione come quella descritta in B1 è 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 è 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 è 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 è invece evidentemente invalido, per totale mancanza di repliche.

## 2.3 Conclusione

Disegnare un esperimento valido è un'arte e richiede profonda attenzione; i principi fondamentali sono tre (controllo, replicazione e randomizzazione) anche se declinarli non è sempre facile in tutti i contesti di ricerca. Resta il fatto che nessuna informazione scientificamente fondata può essere ottenuta da un esperimento che sia invalido, per cattiva interpretazione di uno dei principi anzidetti.

---

## 2.4 Per approfondire un po'...

1. Daniel, Johnnie. 2011. Sampling Essentials: Practical Guidelines for Making Sampling Choices. USA: SAGE.
2. Fisher, Ronald A. (1971) [1935]. The Design of Experiments (9th ed.). Macmillan. ISBN 0-02-844690-9.

3. Hurlbert, S., 1984. Pseudoreplication and the design of ecological experiments. *Ecological Monographs*, 54, 187-211
4. Kuehl, R. O., 2000. Design of experiments: statistical principles of research design and analysis. Duxbury Press (CHAPTER 1)

## Capitolo 3

# Progettare un esperimento

Qualunque sia l'ambito scientifico, nella progettazione di un esperimento possiamo individuare alcune fasi fondamentali, che proviamo ad elencare:

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

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

### 3.1 Ipotesi scientifica $\rightarrow$ obiettivo dell'esperimento

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

## 3.2 Identificazione dei fattori sperimentali

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

### 3.2.1 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 è completamente incrociato.
2. Immaginiamo di voler confrontare due specie in agricoltura biologica (orzo e tritcale), con tre varietà ciascuna (A, B e C per orzo, D, E e F per tritcale). Anche in questo caso abbiamo sei trattamenti: orzo-A, orzo-B, orzo-C, tritcale-D, tritcale-E e tritcale-F, ma il disegno è



innestato, perché per il fattore sperimentale ‘varietà’ i livelli cambiano a seconda dei livelli del fattore ‘specie’.

### 3.2.2 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

1. non sottoposto a trattamento
2. trattato con placebo
3. trattato secondo le modalità usuali di riferimento

Ad esempio, è usuale includere in un confronto varietale, la varietà di riferimento, che ci consente di capire se le prestazioni delle nuove varietà sono effettivamente interessanti oppure no.

Per quello che riguarda invece gli studi tossicologici, è evidente l'importanza di includere un controllo non trattato. Il placebo è una preparazione che contiene tutti gli ingredienti della formulazione attiva, meno che il principio attivo. Il placebo si rende necessario in una serie di circostanze, ad esempio:

1. quando il soggetto è influenzabile e può reagire alla semplice idea di essere stato trattato (effetto placebo)
2. quando i co-formulanti o la soluzione impiegata per veicolare il principio attivo possono mostrare un effetto sul soggetto

### 3.2.3 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 località ed ogni altro elemento che permette di raggruppare i soggetti. Anche questi *blocking factors* devono essere chiaramente identificati ed elencati.

### 3.3 Identificazione delle unità sperimentali

#### 3.3.1 Cornice di campionamento

Prima di iniziare un esperimento, deve essere chiaro qual è la popolazione di riferimento (cornice di campionamento). Ad esempio, se vogliamo determinare la produttività delle varietà di tabacco e la loro adattabilità alle condizioni ombre, la cornice di campionamento sarà la media e alta valle del Tevere. Se invece vogliamo individuare la risposta di bovini adulti ad un certo tipo di alimentazione, dovremo campionare soggetti di entrambi i sessi, diverse età (ma comunque adulti) e in buone condizioni di salute. Insomma, la cornice di campionamento deve essere composta da soggetti che presentano tutte le caratteristiche richieste dall'obiettivo dell'esperimento.

La scelta della cornice di campionamento è fondamentale, perché è ad essa che si riferiscono i risultati ottenuti; ad esempio, se la cornice di campionamento è la media valle del Tevere, i risultati ottenuti non potranno essere rappresentativi della Pianura Padana oppure del Tavoliere delle Puglie.

#### 3.3.2 Scelta delle unità sperimentali

All'interno della cornice di campionamento, adottando criteri rigorosi, andremo a scegliere i soggetti da includere in prova. I soggetti dovranno essere rappresentativi della cornice di campionamento, ma, per il resto, il più possibile omogenei, per minimizzare le fluttuazioni casuali di risposta.

Per quanto riguarda la sperimentazione di pieno campo, l'omogeneità dell'ambiente è fondamentale per aumentare la precisione dell'esperimento, cosa che si consegue, innanzitutto, con la scelta dell'appezzamento giusto. Questa scelta è particolarmente delicata ed è guidata soprattutto 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 a scegliere correttamente l'appezzamento, è importante anche porre in atto alcune operazioni che consentano di incrementare ulteriormente l'omogeneità dell'appezzamento prescelto. Ad esempio, talvolta si usa far precedere la prova da una coltura di 'omogeneizzazione', ad esempio avena, che è 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.

### 3.3.3 Unità sperimentali in campo: le parcelle

Solitamente, nella ricerca biologica, le unità sperimentali sono chiaramente definite: un animale, una persona, un insetto, un'aliquota di terreno. In genere, qualunque esse siano, debbono essere chiaramente identificate prima di procedere all'allocazione dei trattamenti.

Nella sperimentazione di pieno campo, le unità sperimentali sono costituite dalle cosiddette 'parcelle', che, almeno inizialmente, non sono chiaramente identificate. La loro identificazione, dopo aver selezionato l'appezzamento giusto e averlo reso più uniforme possibile, 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 è che ogni parcella deve contenere un numero di piante sufficientemente alto da essere rappresentativo. Per questo motivo le colture a bassa fittezza (es. mais) hanno sempre bisogno di parcelle più grandi che non quelle ad alta fittezza (es. frumento). 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.

Tenendo conto degli aspetti detti in precedenza, riteniamo che le colture ad elevata fittezza (frumento, cereali, erba medica...) dovrebbero avere parcelle di almeno 10-20 m<sup>2</sup>, mentre a bassa fittezza (mais, girasole...) dovrebbero avere parcelle di almeno 20-40 m<sup>2</sup>. Queste dimensioni sono riferite alla superficie utile di raccolta, non alla dimensione totale: se si ritiene di dover raccogliere solo una parte della parcella per limitare l'effetto bordo, allora le dimensioni totali dovranno essere opportunamente aumentate, rispetto a quanto indicato sopra.

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.

Dopo aver stabilito la forma e la dimensione delle parcelle, si può procedere alla redazione della mappa, tenendo conto che il numero delle parcelle risulta dal prodotto tra il numero delle tesi sperimentali e il numero delle repliche.

In genere, si cerca di fare in modo che l'esperimento non sia troppo lungo (il che potrebbe aumentare la variabilità), ma neanche troppo largo, per evitare di avvicinarsi troppo alle scoline, dove possono manifestarsi ristagni idrici. Lungo il contorno della prova è possibile sistemare 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 di bordo verranno trattate in modo ordinario (semina e diserbo tradizionale del pomodoro).

La figura 3.1 riporta la mappa di un esperimento sistemato su un appezzamento largo 30 metri e lungo 400 metri. In questo caso abbiamo disegnato otto file di parcelle in senso trasversale ( $8 \times 2.25 \text{ m} = 18 \text{ m}$  di larghezza), e quattro parcelle in senso longitudinale. Vediamo in figura che la mappa riporta tutte le informazioni relative al disegno sperimentale, inclusa del Nord, in modo da facilitare l'orientamento della mappa stessa. Un altro fondamentale aspetto è che le parcelle sono tutte chiaramente identificate con un numero.

### 3.4 Allocazione dei trattamenti e disegno sperimentale

Il problema dell'allocazione dei trattamenti non si pone con gli esperimenti osservazionali, in quanto con questi si scelgono unità sperimentali già 'naturalmente' trattate.

Per tutti gli esperimenti disegnati si pone invece il problema di scegliere quali soggetti trattare e con cosa. A seconda di quali vincoli introduciamo nella selezioni dei soggetti possiamo avere diversi schemi sperimentali. Quelli che

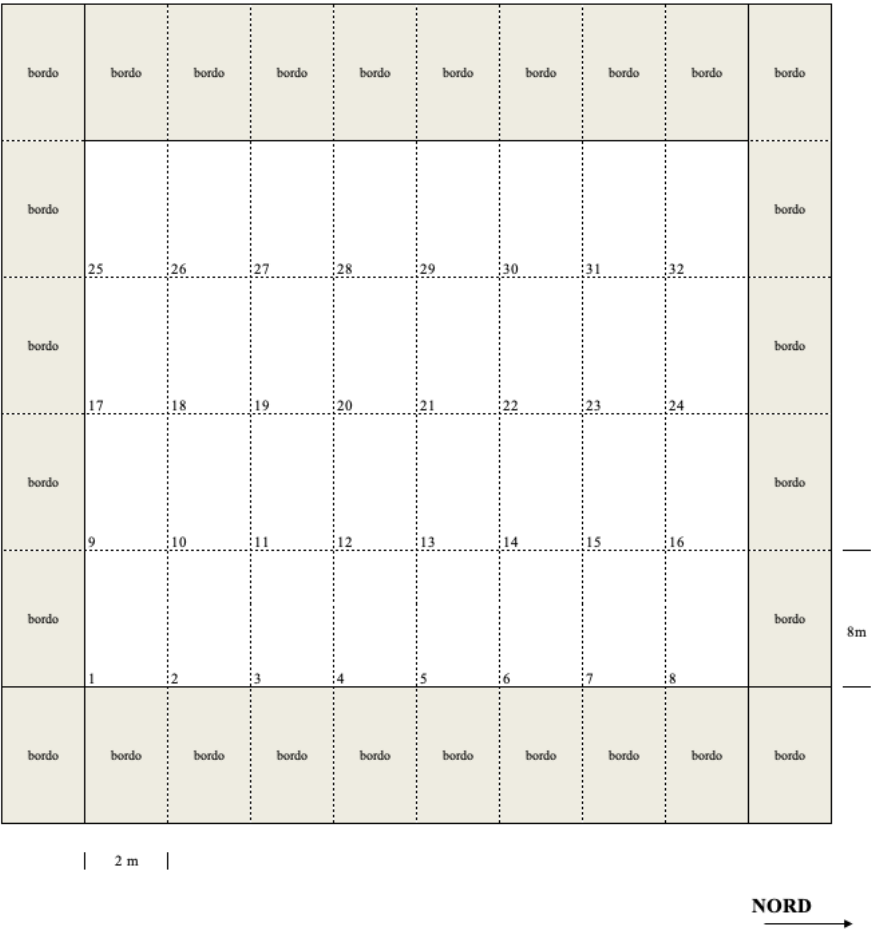


Figura 3.1: Mappa di campo di un esperimento con 32 parcelle

descriviamo di seguito, sono quelli più comunemente usati nella sperimentazione di pieno campo, ma, con le opportune modifiche, possono trovare impiego anche in molte altre discipline scientifiche.

### 3.4.1 Disegni completamente randomizzati

Per queste prove, le più semplici, la scelta dei soggetti da trattare è totalmente casuale, senza vincoli di sorta. Il vantaggio principale è la semplicità; lo svantaggio sta nel fatto che tutte le eventuali differenze e disomogeneità tra unità sperimentali restano non riconosciute ed entrano nella definizione dell'errore sperimentale. Per questo, i disegni completamente randomizzati sono utilizzati soprattutto per le situazioni di buona uniformità ambientale e tra i soggetti.

Come esempio mostriamo un disegno completamente randomizzato utilizzando le parcelle della figura 3.1, dove abbiamo allocato 8 trattamenti (identificati con le lettere da A ad H) con quattro repliche. Come si può notare, l'allocazione è completamente casuale (figura 3.2)

### 3.4.2 Disegni a blocchi randomizzati

Quando le unità sperimentali non sono totalmente omogenee, ma vi è una certa variabilità per una qualche caratteristica rilevante, potremo dividere i soggetti in base a questa caratteristica, in tanti gruppi quante sono le repliche.

Ad esempio, nel caso dello schema in figura 3.1, è lecito aspettarsi un gradiente trasversale, dato che il campo sarà certamente meno fertile vicino alle scoline. Per questo motivo, dato che abbiamo scelto di fare quattro repliche, divideremo l'appezzamento 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 è 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 (3.3)

Un disegno a blocchi randomizzati non è solo tipico della sperimentazione di campo. Ad esempio, volendo determinare la contaminazione da micotossine

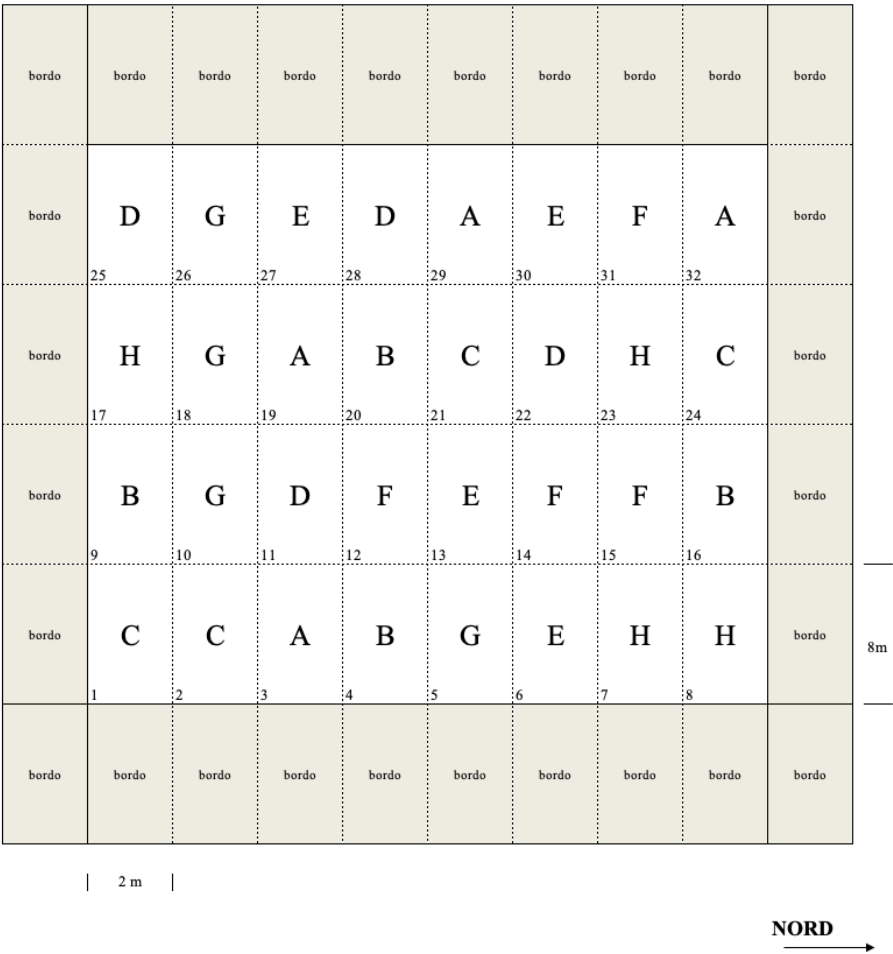


Figura 3.2: Esempio di uno schema sperimentale a randomizzazione completa

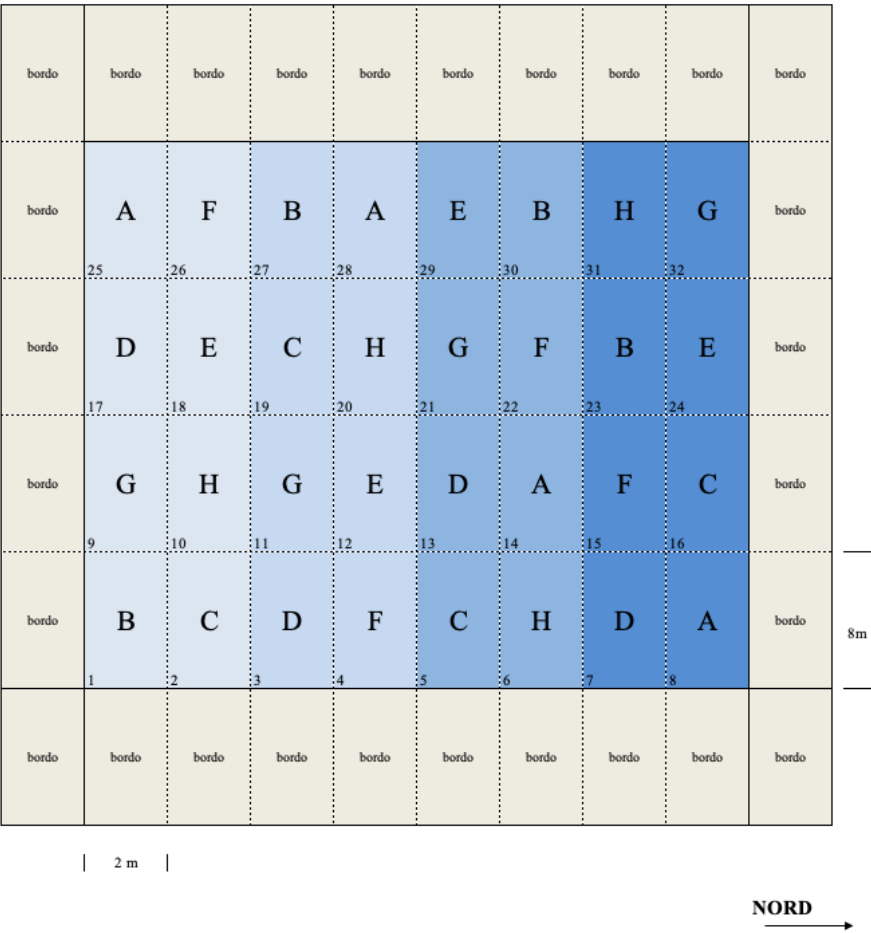


Figura 3.3: Esempio di uno schema sperimentale a blocchi randomizzati



nelle confezioni di datteri, a seconda della modalità di confezionamento (es. carta, busta di plastica, scatola di plastica perforata), si può sospettare che il supermercato nel quale le confezioni vengono vendute potrebbe avere un certo effetto, legato alle modalità di conservazione. Per cui, invece che prelevare trenta confezioni (dieci per metodo) a caso nei supermercati di Perugia, scegliamo dieci supermercati e in ognuno, prendiamo una confezione per tipo. In questo caso, il supermercato fa da blocco.

In generale, potremmo immaginare un esperimento con trattamenti che vengono allocati a caso agli animali di una stalla e ripetuti su stalle diverse, o a soggetti in guppi omogenei di età e così via.

Il vantaggio del disegno a blocchi randomizzati sta nel fatto che le differenze tra gruppi sono spiegabili attraverso l'appartenenza ad un determinato gruppo e possono quindi essere scorporate dal calcolo dell'errore sperimentale.

### 3.4.3 Disegni a quadrato latino

In questo caso, le unità sperimentali presentano due 'gradienti', cioè vi sono differenze legate a due elementi importanti, oltre al trattamento sperimentale. Vediamo un esempio.

Una certo oggetto richiede un solo operatore per essere costruito, ma l'operazione può essere eseguita in quattro modi diversi. Vogliamo capire qual è il modo più veloce e, pertanto, pianifichiamo un esperimento. L'unità sperimentale è 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, può operare con tutti e quattro i metodi. Quindi possiamo disegnare un esperimento in cui il turno fa da unità sperimentale e l'operatore fa da blocco (esperimento a blocchi randomizzati).

Tuttavia, in ogni blocco (operatore) vi è un gradiente, nel senso che i turni successivi al primo sono via via meno efficienti, perché l'operatore accumula stanchezza. Per tener conto di questo potremmo lasciare all'operatore un congruo periodo di tempo tra un turno e l'altro. Oppure, potremmo 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, perché in esso sono contenuti tutti i metodi. Ma anche il turno (per tutti gli operatori) fa da

	Operatore 1	Operatore 2	Operatore 3	Operatore 4
Turno 1	A	C	D	B
Turno 2	D	A	B	C
Turno 3	B	D	C	A
Turno 4	C	B	A	D

Figura 3.4: Allocazione di quattro metodi di lavoro (A, B, C e D), tra quattro operatori, in quattro turni, seguendo uno schema a quadrato latino

blocco, in quanto in esso sono ancora contenuti tutti i metodi. Proviamo a schematizzare, nella figura seguente (3.4 ).

Questo schema prende il nome di quadrato latino, in quanto il numero delle repliche è uguale al numero dei trattamenti e, schematizzando lo schema su una mappa, otteniamo una griglia quadrata, nella quale ogni trattamento occupa tutte le righe e tutte le colonne. Chi lo conosce, riconosce in questo schema i principi di fondo del Sudoku.

Questo disegno è utile, perché possiamo dar conto sia delle differenze tra righe (turni), che delle differenze tra colonne (operatori), in modo da ridurre al minimo possibile la variabilità inspiegata. Lo svantaggio sta nel fatto che, dovendo avere tante repliche quanti sono i trattamenti, è utilizzabile solo per esperimenti abbastanza piccoli.

### 3.5 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 è costituita da una singola pianta, possiamo avere le seguenti variabili: il pro-

dotto 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.

### 3.5.1 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.

### 3.5.2 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 (scala Likert). Di conseguenza possiamo confrontare categorie diverse ed esprimere un giudizio di ordine (2 è maggiore di 1, 3 è 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.

### 3.5.3 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 è uguale a quella fra 2 e 4 e doppia di quella tra 1 e 2). Una tipica variabile discreta è il conteggio di piante infestanti all'interno di una parcella di terreno.

Le variabili discrete consentono la gran parte delle operazioni matematiche e permettono di calcolare molte importanti statistiche come la media, la mediana, la varianza e la deviazione standard.

### 3.5.4 Variabili quantitative continue

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

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

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

### 3.5.5 Rilievi visivi e sensoriali

Nella pratica sperimentale è molto frequente l'adozione di metodi di rilievo basati sull'osservazione di un fenomeno attraverso uno dei sensi (più 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 fitotossicità vengono spesso rilevati visivamente, su scale da 0 a 100 o simili.

I vantaggi di questa tecnica sono molteplici:

1. Basso costo ed elevata velocità
2. Possibilità 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, cioè:

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.

### 3.5.6 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.

## 3.6 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 densità più alte e poi diradare, per assicurare una migliore uniformità di impianto
2. Prelevare da ogni parcella più 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 produttività almeno del 20% superiore rispetto a quanto avviene nella normale pratica agricola.

### **3.7 Scrivere un progetto/report di ricerca: semplici indicazioni**

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

Nella redazione di un progetto di ricerca o di un report, è 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. Unità 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.
- 

### **3.8 Per approfondire un po'...**

1. Cochran, W.G., Cox, G.M., 1950. Experimental design. John Wiley & Sons, Inc., Books.
2. LeClerc, E.L., Leonard, W.H., Clark, A.G., 1962. Field Plot Technique. Burgess Publishing Company, Books.

## Capitolo 4

# Modelli matematici ed analisi dei dati

L'eredità galileiana ci porta ad immaginare che il funzionamento della natura sia basato su una serie di relazioni causa-effetto, descrivibili utilizzando il linguaggio universale della matematica. La conoscenza esatta di queste relazioni, nella teoria, ci potrebbe consentire di prevedere l'andamento di ogni fenomeno naturale, almeno quelli osservabili con sufficiente precisione.

In effetti era proprio questa l'ambizione più grande degli scienziati all'inizio dell'ottocento: conoscendo lo stato iniziale di un sistema, doveva essere possibile prevederne l'evoluzione futura. In realtà si è ben presto scoperto che si trattava di un'ambizione irrealistica, non tanto e non solo per la comparsa della meccanica quantistica un secolo dopo, ma anche per l'aumento di importanza degli studi in ambito psichiatrico e medico/biologico. Questi studi, infatti, venivano (e vengono) eseguiti su organismi viventi molto complessi, che, se sottoposti allo stesso stimolo, danno risposte altamente variabili e, spesso, anche difficilmente misurabili e controllabili. Immaginiamo quanto possa essere difficile quantificare uno stato legato ad una patologia mentale e individuare un pattern di risposta ad un certo stimolo, ad esempio farmacologico.

Queste difficoltà fecero prevalere, tra i biologi, la convinzione che la natura funzionasse in base a meccanismi deterministici ben definiti, anche se difficilmente osservabili nella pratica sperimentale, a causa dei numerosi elementi d'incertezza che si manifestavano nel corso delle osservazioni sperimentali. Insomma, la natura è perfetta, ma l'osservazione è fallace, perché influenzata



dalla presenza di una forte componente stocastica e imprevedibile, che va sotto il nome generico di 'errore sperimentale'.

Dell'errore sperimentale abbiamo già parlato nei capitoli precedenti. Abbiamo anche visto che Ronald Fisher, nel suo famoso testo "Il disegno degli esperimenti" ha posto le basi per una corretta metodica sperimentale, volta a minimizzare l'impatto della componente stocastica e, soprattutto, ad impedire che essa possa confondersi con gli effetti degli stimoli sperimentali in studio. Minimizzare, tuttavia, non significa eliminare ed è evidente che, pur con tutti gli sforzi possibili, i risultati sperimentali saranno influenzati sempre e comunque da una certa quota di variabilità stocastica. Si vengono quindi a creare due contrapposte situazioni:

1. la verità 'vera', immanente, che 'agisce' in base a meccanismi deterministici causa-effetto ben definiti.
2. La 'verità' sperimentale, che si produce a partire dalla verità 'vera', per effetto dell'azione di elementi perturbativi casuali, che non ci permettono di osservare la verità 'vera'.

Tenendo conto di questo, nella logica galileiana, possiamo provare ad utilizzare dei modelli matematici per descrivere le nostre osservazioni sperimentali e come esse si producono. Tuttavia, nessun modello è da considerare completo, se non è caratterizzato dalla capacità di descrivere sia la componente deterministica che quella stocastica, che sono alla base della formazione delle osservazioni sperimentali.

## 4.1 Verità 'vera' e modelli deterministici

In semplice linguaggio algebrico, possiamo porre un modello deterministico causa-effetto utilizzando una funzione di questo tipo:

$$Y_E = f(X, \theta)$$

dove  $Y_E$  è l'effetto atteso dello stimolo  $X$ , secondo la funzione  $f$ , basata su una collezione di parametri  $\theta$ .

In questo modello vi sono una serie di componenti, che proviamo a guardare un po' più nel dettaglio.

La risposta attesa ( $Y_E$ ) è l'oggetto del nostro studio e può assumere le forme più disparate: spesso è numerica, ma a volte rappresenta una qualità.

In questo libro considereremo solo la situazione in cui  $Y$  è rappresentato da una sola variabile (analisi univariata), ma esistono casi in cui viene osservata e analizzata la risposta di soggetti in relazione a molte variabili (analisi multivariata).

Lo stimolo sperimentale ( $X$ ) è costituito da una o più variabili continue, discrete o categoriche, che rappresenta/ano il/i trattamento/i sperimentale/i (fattore/i sperimentale/i). Insieme ad  $Y$ , è l'elemento noto di un esperimento, in quanto viene definito *a priori* con il disegno sperimentale.

La 'funzione' di risposta ( $f$ ) è un'equazione, altrimenti detta 'modello matematico'. L'equazione può essere lineare o non-lineare ed è selezionata o in base a considerazioni di carattere biologico, o con un approccio puramente empirico, nel quale osservo la risposta e scelgo un'equazione la cui forma si adatta bene ad essa.

I parametri di una funzione ( $\theta$ ) sono un insieme di valori numerici che definiscono il modello. Nel prossimo paragrafo vedremo qualche esempio.

### 4.1.1 Qualche esempio di modello deterministico

Il modello più semplice è il cosiddetto modello della media:

$$Y = \mu$$

Con questo modello si vuole indicare che un'osservazione dovrebbe conformarsi ad un certo valore atteso, come effetto di un unico stimolo sperimentale noto. Ha un solo parametro, cioè  $\mu$ .

Un modello analogo, ma più complesso è il cosiddetto modello ANOVA:

$$Y = \begin{cases} \mu_1 & \text{se } X = A \\ \mu_2 & \text{se } X = B \end{cases}$$

In questo caso la risposta attesa dipende dallo stimolo sperimentale  $X$ , che è composto di due trattamenti: se il soggetto è trattato con  $A$ , fornisce la risposta  $\mu_1$ , se è trattato con  $B$  fornisce  $\mu_2$ . Il trattamento sperimentale è costituito da una variabile categorica con due modalità, ma l'estensione a più modalità è immediata. In questo caso, abbiamo due parametri ( $\mu_1$  e  $\mu_2$ ).

Un ulteriore esempio di modello che vedremo in questo libro è la regressione lineare semplice, dove la relazione di risposta è descrivibile con una retta, la cui equazione generale è:

$$Y = a + b \times X$$

In questo caso sia la  $Y$  che la  $X$  sono variabili quantitative e vi sono due parametri  $a$  e  $b$ .

I modelli finora descritti sono lineari, ma esistono numerosi funzioni che descrivono relazioni curvilinee. Come, ad esempio, la parabola:

$$Y = a + bX + cX^2$$

caratterizzata da tre parametri, oppure la funzione esponenziale:

$$Y = a e^{bX}$$

caratterizzata da due parametri ( $a$  e  $b$ ), mentre  $e$  è l'operatore di Nepero. Delle funzioni curvilinea parleremo al termine di questo libro.

## 4.2 Genesi deterministica delle osservazioni sperimentali

Le equazioni esposte più sopra sono tutte nella loro forma generale e non sono utilizzabili se ai parametri non viene sostituito un valore numerico. E' proprio questo il nostro punto di partenza: un fenomeno scientifico può essere descritto attraverso un'equazione e dei parametri.

Ad esempio, potremmo immaginare che la risposta produttiva ( $Y$ ) di una coltura (es. frumento) dipenda dalla dose della concimazione azotata ( $X$ ), seguendo un andamento lineare, con  $a = 20$  e  $b = 0.3$ . Rifacendosi alla notazione esposta sopra diremo che  $\theta$  è l'insieme dei valori 20 e 0.3.

Se questo assunto è vero, un eventuale esperimento di concimazione azotata, in assenza di qualunque fattore perturbativo, dovrebbe dare risultati assolutamente prevedibili. Ad esempio, se concimiamo il frumento con 0, 30, 60, 90, 120 e 150 kg/ha di azoto, dovremmo osservare le risposte riportate qui di seguito.

```

X <- c(0, 30, 60, 90, 120, 150)
Ye <- 20 + 0.3 * X
Ye
## [1] 20 29 38 47 56 65

```

Qualcuno potrebbe obiettare che si tratta di una situazione irrealistica, perché la relazione tra concimazione azotata e produzione del frumento non è lineare. Non importa; in questo momento vogliamo semplicemente illustrare qual è la genesi delle osservazioni sperimentali. Fondamentalmente postuliamo l'esistenza di un modello matematico deterministico (causa-effetto) che, in assenza di errore sperimentale, è in grado di descrivere il comportamento della natura in una data situazione pedo-climatica.

### 4.3 Errore sperimentale e modelli stocastici

Tuttavia esiste un problema: l'errore sperimentale, puramente stocastico, confonde le nostre osservazioni e le rende diverse da quanto previsto dal modello deterministico. Come fare per incorporare questi effetti stocastici in un modello matematico? Ne parliamo immediatamente attraverso un esempio, semplice, ma concreto.

Immaginiamo un campo di frumento, di notevoli dimensioni. Un campo nella valle del Tevere, con milioni di piante geneticamente simili, in un ambiente abbastanza uniforme da un punto di vista del microclima. Immaginiamo di voler determinare l'altezza delle piante di questo campo. Immaginiamo di non avere limitazioni e di poter determinare l'altezza di tutte le piante dell'appezzamento. La nostra popolazione di soggetti diviene una popolazione di misure. Come è fatta questa popolazione? Quali sono le sue caratteristiche? Basiamoci sulla nostra esperienza professionale, cercando di utilizzare argomenti che possano essere condivisibili per l'intera comunità scientifica.

In primo luogo, possiamo dire che l'altezza delle piante dovrebbe essere quella dettata dal loro patrimonio genetico. Poniamo che questa altezza sia  $\mu = 100$ ; di conseguenza, il valore atteso di altezza è:

$$Y_E = \mu = 100$$

In realtà, questo valore  $\mu$  non è osservabile, perché, pur nella loro relativa omogeneità, l'ambiente e il patrimonio genetico non sono totalmente uguali, il che fa sì che ogni pianta abbia la sua altezza, diversa da quella delle altre piante circostanti. Quindi non osserveremo esattamente  $Y_E$ , ma, al suo posto osserveremo  $Y_O \neq Y_E$ , con:

$$Y_O = \mu + \varepsilon$$

dove  $\varepsilon$  è appunto una misura della componente stocastica individuale che distorce i risultati. Che valori potrebbe assumere  $\varepsilon$ ? I valori individuali non possiamo conoscerli, ma possiamo fare alcune considerazioni probabilistiche: se il valore atteso è 100, trovare altezze comprese tra 99 e 101 cm dovrebbe essere molto più frequente che non trovare altezze pari a 40 cm o 180 cm. Quindi trovare valori di  $\varepsilon$  vicini allo 0 dovrebbe essere molto più frequente che non trovarli lontani.

Ci chiediamo, esiste una funzione che ci permetta di assegnare valori di probabilità alle diverse altezze che troviamo in un campo di frumento? La risposta è sì: funzioni di questo tipo si chiamano **funzioni di probabilità**.

### 4.3.1 Funzioni di probabilità

Se avessimo rilevato una qualità del soggetto, come il sesso (M/F), la mortalità (vivo/morto), la germinabilità (germinato/non germinato), avremmo una variabile categorica nominale e potremmo calcolare le probabilità definite come rapporto tra il numero degli eventi favorevoli e il numero totale di eventi possibili (probabilità 'frequentista').

Ad esempio, immaginiamo di aver rilevato il numero di germogli 'lateral' di accostamento di 20 piante di frumento e di averne trovate 4 con 0 germogli, 6 con 1 germoglio, 8 con due germogli e 2 con tre germogli. La funzione che assegna la probabilità  $P$  ad ognuno dei quattro eventi  $X$  possibili (**funzione di probabilità**) è:

$$P(X) = \begin{cases} 4/20 = 0.2 & \text{se } X = 0 \\ 6/20 = 0.3 & \text{se } X = 1 \\ 8/20 = 0.4 & \text{se } X = 2 \\ 2/20 = 0.1 & \text{se } X = 3 \end{cases}$$

Viene ad essere definita una **distribuzione di probabilità**, che ha due caratteristiche importanti:

1.  $P(X)$  è sempre non-negativo (ovvio! le probabilità sono solo positive o uguali a 0);
2. la somma delle probabilità di tutti gli eventi è sempre pari ad 1 (ovvio anche questo: la probabilità che capiti uno qualunque degli eventi è sempre 1).

Se gli eventi possibili sono ordinabili (come nel caso precedente), oltre alla funzione di probabilità, si può definire anche la **funzione di probabilità cumulata**, detta anche **funzione di ripartizione** con la quale si assegna ad ogni evento la sua probabilità più quella di tutti gli eventi ‘inferiori’. Nell’esempio precedente:

$$P(X) = \begin{cases} 0.2 & \text{se } X \leq 0 \\ 0.5 & \text{se } X \leq 1 \\ 0.9 & \text{se } X \leq 2 \\ 1.0 & \text{se } X \leq 3 \end{cases}$$

Per una distribuzione di probabilità come questa (classi numeriche ordinate), considerando il valore centrale di ogni classe, possiamo calcolare la media (valore atteso) come:

$$\mu = E(X) = \sum [x_i \cdot P(X = x_i)]$$

e la varianza come:

$$\sigma^2 = Var(X) = E[X - E(X)]^2 = \sum [(x_i - \mu)^2 \cdot P(X = x_i)]$$

In questo caso specifico, la media è pari a:

```
mu <- 0 * 0.2 + 1 * 0.3 + 2 * 0.4 + 3 * 0.1
mu
## [1] 1.4
```

e la varianza è pari a:

```
(0 - mu)^2 * 0.2 + (1 - mu)^2 * 0.3 + (2 - mu)^2 * 0.3 +
(3 - mu)^2 * 0.2
## [1] 1.06
```

Mediamente, le nostre piante hanno 1.4 germogli con una varianza pari a 1.06.

### 4.3.2 Funzioni di densità

Ciò che abbiamo detto finora non si applica al nostro caso, in quanto abbiamo rilevato una variabile continua (altezza) e non abbiamo intenzione di discretizzarla in classi. In teoria, le altezze che possiamo riscontrare sono pressoché infinite e non ha molto senso chiedersi, ad esempio, qual è la probabilità di trovare un individuo alto esattamente 96 cm (e non 96.0000001 cm, o 95.99999 cm). Capiamo da soli che questa probabilità è un infinitesimo.

Al contrario, come abbiamo visto più sopra, possiamo calcolare la probabilità di ottenere un valore compreso in un intervallo, per esempio da 80 a 90 cm. Tuttavia, abbiamo detto di non voler discretizzare, anche perché la probabilità dipenderebbe dall'ampiezza dell'intervallo prescelto, il che introdurrebbe un elemento arbitrario. Possiamo tuttavia pensare di calcolare la **densità di probabilità**, vale a dire il rapporto tra la probabilità di un intervallo e la sua ampiezza (cioè la probabilità per unità di ampiezza dell'intervallo; per questo si parla di densità). E' evidente che se un intervallo diventa infinitamente piccolo anche la probabilità tende a zero con la stessa 'velocità', in modo che la densità di probabilità tende ad un numero finito (ricordate il limite del rapporto di polinomi?).

Insomma, con i fenomeni continui non possiamo lavorare con la probabilità dei singoli eventi, ma possiamo lavorare con la densità di probabilità e definire quindi apposite **funzioni di densità**. Analogamente alle funzioni di probabilità, le funzioni di densità debbono avere due caratteristiche:

1. assumere solo valori non-negativi;
2. la somma delle probabilità di tutti gli eventi possibili, calcolabile come integrale della funzione di densità, deve essere unitaria (anche in questo caso la densità di probabilità di tutti gli eventi possibili è pari ad 1).

Data una funzione di densità, possiamo costruire la corrispondente **funzione di probabilità cumulata**, facendo l'integrale per ogni evento pari o inferiore a quello dato. Più in generale, per variabili continue sia la funzione di ripartizione (probabilità cumulata), che la media o la devianza sono definite ricorrendo agli integrali:

$$\begin{aligned}
P(X) &= f(x) \\
P(X \leq x) &= \int_{-\infty}^x f(x)dx \\
\mu = E(X) &= \int_{-\infty}^{+\infty} xf(x)dx \\
\sigma^2 = Var(X) &= \int_{-\infty}^{+\infty} (x - \mu)^2 f(x)dx
\end{aligned}$$

In pratica, vedremo che, a seconda della funzione di densità, è possibile adottare formule semplificate per le diverse statistiche descrittive.

## 4.4 La distribuzione normale (curva di Gauss)

Torniamo ancora alla nostra popolazione di misure, relative alle altezze del frumento nella media Valle del Tevere. E' ragionevole pensare che, effettuando le misurazioni con uno strumento sufficientemente preciso e in presenza delle sole variazioni casuali (visto che abbiamo idealmente rimosso ogni differenza sistematica spiegabile), i risultati tendono a differire tra di loro, muovendosi intorno ad un valor medio, rispetto al quale le misure superiori ed inferiori sono equiprobabili e tendono ad essere più rare, via via che ci si allontana dal valore medio. Questo ragionamento ci porta verso una densità di probabilità (parliamo di variabili continue) a forma di campana, che potrebbe essere descritta con una funzione continua detta **curva di Gauss**.

La curva è descritta dalla seguente funzione di densità:

$$P(X) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{(X - \mu)^2}{2\sigma^2} \right]$$

ove  $P(X)$  è la densità di probabilità di una certa misura  $X$ , mentre  $\mu$  e  $\sigma$  sono rispettivamente la media e la deviazione standard della popolazione (per la dimostrazione si rimanda a testi specializzati). Le variabili casuali che possono essere descritte con la curva di Gauss, prendono il nome di *variabili normali* o *normalmente distribuite*.

Studiare le principali proprietà matematiche della curva di Gauss è estremamente utile. Ad esempio, senza voler entrare troppo nel dettaglio, guardando la curva di Gauss possiamo notare che:



1. la forma della curva dipende da solo da  $\mu$  e  $\sigma$  (figura @ref{fig:figName51}). Ciò significa che, se prendiamo un gruppo di individui e partiamo dal presupposto (**assunzione parametrica**) che in relazione ad un determinato carattere quantitativo (es. produzione) la distribuzione di frequenza è normale (e quindi può essere descritta con una curva di Gauss), allora basta conoscere la media e la deviazione standard degli individui e immediatamente conosciamo l'intera distribuzione di frequenza (cioè l'intera popolazione di misure);
2. la curva ha due asintoti e tende a 0 quando  $x$  tende a infinito. Questo ci dice che se assumiamo che un fenomeno è descrivibile con una curva di Gauss, allora assumiamo che tutte le misure sono possibili, anche se la loro frequenza decresce man mano che ci si allontana dalla media;
3. la probabilità che la  $x$  assuma valori compresi in un certo intervallo è data dall'integrale della curva di Gauss in quell'intervallo. Ad esempio, la figura @ref{fig:figName52} mostra l'80° percentile, cioè la misura più alta dell'80% delle misure possibili;
4. Se la curva di Gauss è stata costruita utilizzando le frequenze relative, l'integrale della funzione è uguale ad 1. Infatti la somma delle frequenze relative di tutte le varianti possibili non può che essere uguale ad 1;
5. la curva è simmetrica. Questo indica che la frequenza dei valori superiori alla media è esattamente uguale alla frequenza dei valori inferiori alla media.
6. dato  $\sigma$ , possiamo dire che la frequenza dei valori superiori a  $\mu + \sigma$  è pari al 15.87% ed è uguale alla frequenza dei valori inferiori a  $\mu - \sigma$ .

## 4.5 Modelli ‘a due facce’

A questo punto, sempre in relazione al nostro frumento, possiamo scrivere che l'altezza della pianta  $i$  è:

$$Y_i = \mu + \varepsilon_i$$

dove abbiamo introdotto l'elemento stocastico  $\varepsilon$ , per ogni soggetto  $i$ , tale che:

$$\varepsilon \sim N(0, \sigma)$$

cioè la componente stocastica  $\varepsilon$  è normalmente distribuita, con media 0 e deviazione standard  $\sigma$ . E'abbastanza evidente che è possibile scrivere:

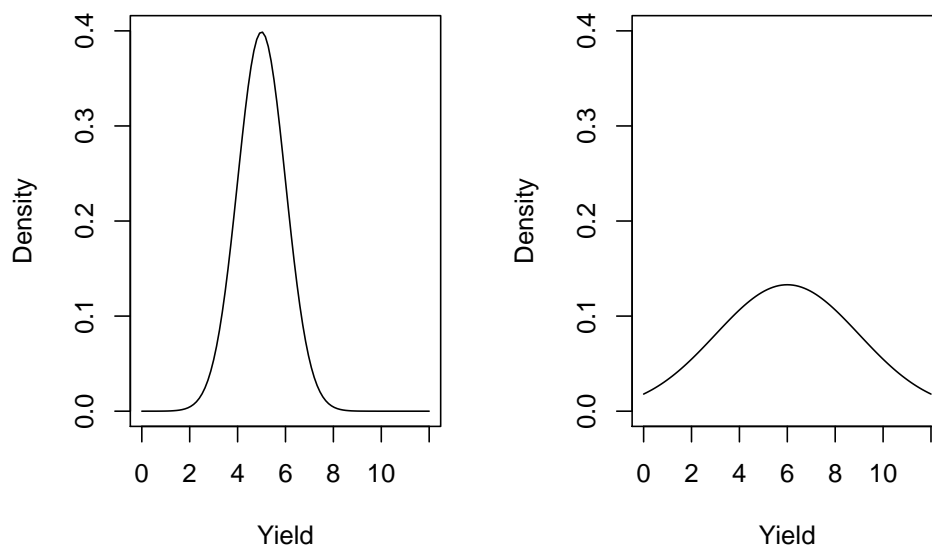


Figura 4.1: Distribuzioni normali con diversa media e deviazione standard (rispettivamente 5 e 1 a sinistra, 6 e 3 a destra)

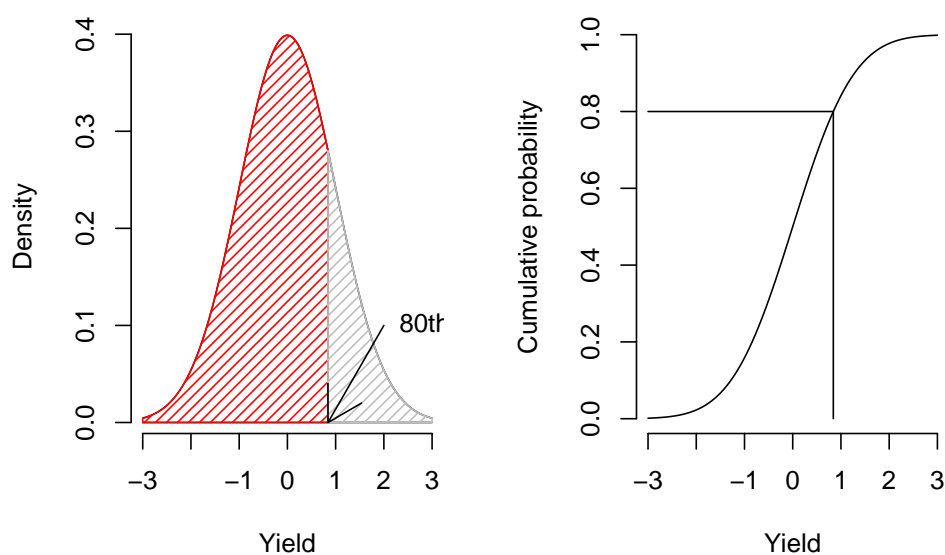


Figura 4.2: Integrale della curva di densità normale (80° percentile; sinistra) e curva di probabilità cumulata (destra)

$$Y_i \sim N(\mu, \varepsilon)$$

cioè che l'altezza del frumento è normalmente distribuita con media  $\mu$  e deviazione standard  $\sigma$ . Dato che si tratta di una semplice traslazione di una distribuzione normale lungo l'asse delle ascisse (come in figura @ref{figName51}), le due espressioni sono totalmente equivalenti.

Ora si può dire che conosciamo perfettamente la popolazione di partenza se conosciamo  $\mu$  e  $\sigma$ , cioè la parte ('faccia') deterministica e la parte ('faccia') stocastica del modello. Se quindi immaginiamo che  $\mu = 100$  (come abbiamo detto in precedenza) e  $\sigma = 8$ , possiamo risolvere alcuni semplici esercizi, utilizzando le funzioni di calcolo di probabilità di R.

**ESERCIZIO 1.** Calcolare la densità di un'altezza pari a 120 cm.

```
dnorm(120, mean = 100, sd = 8)
## [1] 0.002191038
```

**ESERCIZIO 2.** Qual è la probabilità di ottenere piante con altezza inferiore a 80 cm?

```
pnorm(80, mean = 100, sd = 8)
## [1] 0.006209665
```

**ESERCIZIO 3.** Qual è la probabilità di ottenere piante con altezza superiore a 110 cm?

```
pnorm(110, mean = 100, sd = 8, lower.tail = F)
## [1] 0.1056498
```

Si utilizza l'argomento `lower.tail=FALSE`, in quanto stiamo cercando la probabilità di un'a concentrazione pari o superiore ad 1.1, e non pari od inferiore.'altezza pari o superiore a 110 cm (upper-tail) e non quella pari o inferiore a 110 cm (lower-tail), che sarebbe fornita di default. E' totalmente equivalente utilizzare la funzione sottostante.

```
1 - pnorm(110, mean = 100, sd = 8)
## [1] 0.1056498
```

**ESERCIZIO 4.** Qual è la probabilità di ottenere piante con altezza compresa tra 80 e 110 cm?

```
pnorm(110, mean = 100, sd = 8) - pnorm(80, mean = 100, sd = 8)
## [1] 0.8881406
```

**ESERCIZIO 5.** Qual è quella misura che è superiore al 90% di tutte le piante del campo (90° percentile)?

```
qnorm(0.9, 100, 8)
## [1] 110.2524
```

**ESERCIZIO 6.** Qual è quella misura che è inferiore al 20% di tutte le piante del campo (80° percentile)?

```
qnorm(0.8, 100, 8)
## [1] 106.733
qnorm(0.2, 100, 8, lower.tail=F)
## [1] 106.733
```

**ESERCIZIO 7.** Quali sono quei due valori, simmetrici rispetto alla media e tali da formare un intervallo all'interno del quale cadono il 95% delle piante?

```
qnorm(0.025, 100, 8)
## [1] 84.32029
qnorm(0.975, 100, 8)
## [1] 115.6797
```

## 4.6 E allora?

Cerchiamo di ricapitolare. Le popolazioni di soggetti sperimentali e delle loro misure sono un oggetto largamente ignoto e in conoscibile. Infatti, le caratteristiche dei soggetti della popolazione sono, in parte, determinate in base a relazioni causa-effetto, ma, in altra parte, esse sono puramente stocastiche. Tuttavia è ragionevole supporre che esse seguano una qualche funzione di probabilità/densità (**assunzione parametrica**). Se questo è vero, allora possiamo utilizzare queste funzioni e i loro integrali per calcolare la probabilità di ottenere una certa misura o un certo insieme di misure.

## 4.7 Le simulazioni Monte Carlo

Se quanto abbiamo detto è vero, ogni esperimento scientifico non è altro che un'operazione di campionamento da una certa distribuzione di probabilità. Questo campionamento può essere simulato impiegando un generatore di numeri casuali. Immaginiamo di avere disegnato un esperimento con otto

parcelle (repliche) per determinare la produzione del mais in un certo appezzamento e immaginiamo che queste parcelle costituiscano un campione rappresentativo della popolazione di parcelle di quell'appezzamento. Se la popolazione è distribuita normalmente, con media pari a 12 t/ha e deviazione standard pari ad 1.2 t/ha, allora possiamo simulare i risultati del nostro esperimento come segue:

```
set.seed(1234)
Y <- rnorm(8, 15, 1.2)
Y
## [1] 13.55152 15.33292 16.30133 12.18516 15.51495
## [6] 15.60727 14.31031 14.34404
mean(Y)
## [1] 14.64344
sd(Y)
## [1] 1.328183
```

La generazione di numeri casuali con il computer viene fatta attraverso algoritmi che, a partire da un *seed* iniziale, forniscono sequenze che obbediscono a certe proprietà fondamentali (numeri pseudo-casuali). Il comando 'set.seed(1234)' ci permette di partire dallo stesso valore e quindi di ottenere lo stesso campione. Un'altra cosa da notare è che il nome della funzione che genera numeri casuali è formato con il nome della distribuzione ('norm') più il prefisso 'r'. Questo è vero per tutte le altre distribuzioni in R ('rbinom', 'rt' e così via)

I valori campionati non riflettono le caratteristiche della popolazione, nel senso che la media e la deviazione standard del campione differiscono da quelle della popolazione. E' esattamente ciò che capita durante un esperimento!

## 4.8 Analisi dei dati e 'model fitting'

Secondo il principio illustrato in questo capitolo, un ricercatore arriverebbe a conoscere perfettamente la realtà se riuscisse ad individuare l'equazione e i parametri che governano il fenomeno in studio. Di conseguenza, l'ipotesi scientifica che sta alla base di un esperimento può essere posta sotto forma di modello matematico. Ad esempio, potremmo ipotizzare che la degradazione di un erbicida nel terreno segua una legge di decadimento esponenziale, rappresentabile, in genere, con l'equazione:

$$C = a e^{-kT} + \varepsilon$$

dove  $C$  è la concentrazione dell'erbicida in un dato momento  $T$  ed  $a$  e  $k$  sono i parametri. Per quanto riguarda l'elemento stocastico, possiamo assumere che:

$$\varepsilon \sim N(0, \sigma)$$

In modo equivalente, potremmo scrivere:

$$C \sim N(a e^{-kT}, \sigma)$$

Questo modello è assolutamente generale; se vogliamo specificarlo per una certa situazione sperimentale, ad esempio per la degradazione di imazethapyr a 20°C, possiamo realizzare un esperimento nel quale contaminiamo un terreno con questo erbicida, lo mettiamo a 20°C e, in tempi diversi, preleviamo aliquote di terreno da sottoporre a determinazione analitica. L'analisi dei dati raccolti consisterà nell'individuare  $a$ ,  $k$  e  $\sigma$ , con una tecnica definita di *model fitting*.

Le diverse tecniche di analisi dei dati che descriveremo nei capitoli successivi sono accomunate dall'essere appunto tecniche di *model fitting*. Vedremo anche come queste tecniche possono essere utilizzate per verificare che le osservazioni sperimentali si conformino ad un dato modello (*goodness of fit*) oppure per confrontare due ipotesi alternative poste sotto forma di modelli diversi (*model comparison*).

## 4.9 Per approfondire un po'...

### 4.9.1 Generazione dei dati sperimentali: un esempio più realistico

Immaginiamo di conoscere la legge deterministica che definisce la risposta del frumento alla concimazione azotata. In particolare, immaginiamo che questa risposta produttiva sia fondamentalmente lineare:

$$Y_E = b_0 + b_1 X$$

ed immaginiamo che, senza concimazione ( $X = 0$ ), la produzione sia pari a 25 q/ha ( $b_0 = 25$ ). Immaginiamo che l'incremento produttivo per kg di azoto somministrato sia pari a 0.15 q/ha ( $b_1 = 0.15$ ).

Per individuare questa legge naturale organizziamo un esperimento, con quattro dosi di azoto e quattro repliche. In questo esperimento, come in tutti gli esperimenti, agirà anche una componente stocastica, che in qualche modo sposterà la risposta osservata dalla risposta attesa:

$$Y_o = b_0 + b_1 X + \varepsilon \quad \text{con} \quad \varepsilon \sim N(0, \sigma)$$

Assumiamo che la componente stocastica  $\varepsilon$  sia distribuita normalmente, come media 0 e deviazione standard  $\sigma$ , che immaginiamo essere pari a 2.5 q/ha.

Su questa base, generiamo i dati osservati, nelle seguenti fasi:

1. generiamo i valori attesi ('Yield\_E'), utilizzando il modello deterministico di risposta. Le quattro repliche di una dose hanno, ovviamente, lo stesso valore;
2. aggiungiamo l'elemento stocastico, specifico per ogni osservazione, campionando da una distribuzione normale;
3. creiamo un dataframe con le osservazioni sperimentali

```
set.seed(1234)
Dose <- rep(c(0, 60, 120, 180), each=4)
Yield_E <- 25 + 0.15 * Dose
epsilon <- rnorm(16, 0, 2.5)
Yield <- Yield_E + epsilon
dataset <- data.frame(Dose, Yield)
dataset
##      Dose      Yield
## 1      0 21.98234
## 2      0 25.69357
## 3      0 27.71110
## 4      0 19.13576
## 5     60 35.07281
## 6     60 35.26514
## 7     60 32.56315
## 8     60 32.63342
```

```
## 9    120 41.58887
## 10   120 40.77491
## 11   120 41.80702
## 12   120 40.50403
## 13   180 50.05937
## 14   180 52.16115
## 15   180 54.39874
## 16   180 51.72429
# write.csv(dataset, file = "Nwheat.csv", row.names = F)
```

Il dataset che otteniamo è realistico e lo utilizzeremo per l'analisi (regressione lineare semplice) nel capitolo 12.

### 4.9.2 Modelli stocastici non-normali

Oltre alla distribuzione gaussiana, che è largamente la più importante, esistono molti altri modelli stocastici, sia per eventi continui che discreti. Chi volesse approfondire queste distribuzioni trova informazioni in seguito. Per gli altri vogliamo solo far notare che le funzioni di R per il calcolo di probabilità hanno sempre la stessa sintassi, che, dato il nome della distribuzione (es. 'norm' per la distribuzione normale), assegna il prefisso 'd' per la funzione di probabilità/densità, 'p' per la funzione di probabilità cumulata, 'q' per la funzione quantile. Ad esempio, per la distribuzione binomiale, il nome è 'binom' e, di conseguenza, le funzioni in R sono: 'dbinom()' (probabilità), 'pbinom()' (probabilità cumulata) e 'qbinom()' (funzione 'quantile').

#### t di Student

La distribuzione t di Student è analoga, per forma, ad una distribuzione normale con media 0 e deviazione standard 1. Rispetto a quest'ultima, la dispersione è un po' più ampia, nel senso la probabilità di avere valori lontani dalla media è più alta. In realtà, non esiste una sola distribuzione t di Student, ma ne esistono molte, caratterizzate da un diverso numero di gradi di libertà ( $\nu$ ); maggiore è  $\nu$ , minore la sovradisersione; se il numero di gradi di libertà è infinito, la distribuzione t di Student è identica alla normale standardizzata (distribuzione normale con media 0 e deviazione standard uguale ad 1).

La Figura 4.3 riporta un esempio di come diminuisce la sovradisersione all'aumentare del numero di gradi di libertà.



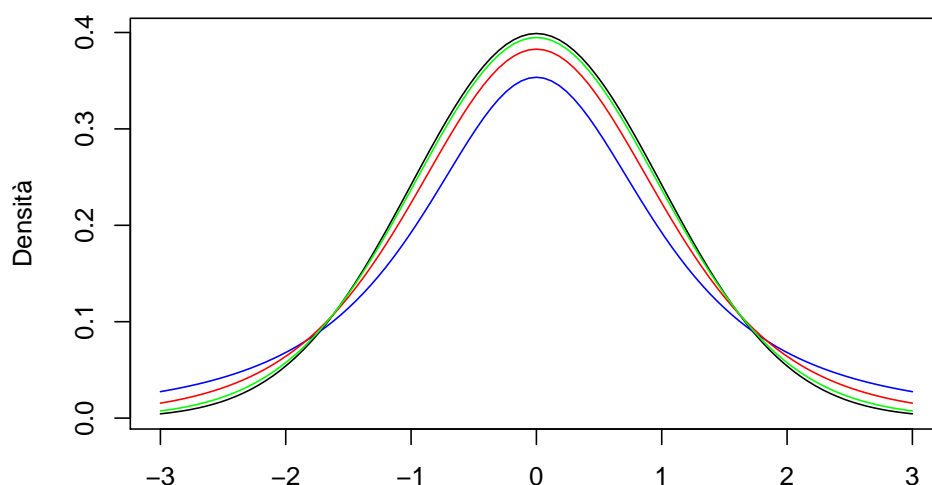


Figura 4.3: Distribuzione  $t$  di Student, con diversi gradi di libertà

### F di Fisher

La distribuzione  $F$  di Fisher è definita solo per valori positivi ed è fortemente asimmetrica. Anche in questo caso, abbiamo una famiglia di distribuzioni, che differiscono tra di loro per due parametri (gradi di libertà)  $\nu_1$  e  $\nu_2$ . Solitamente questa distribuzione viene utilizzata per descrivere il rapporto tra le varianze di coppie di campioni estratti da una distribuzione normale standardizzata, per cui  $\nu_1$  e  $\nu_2$  sono i gradi di libertà del numeratore e del denominatore.

La Figura 4.4 mostra diverse funzioni di densità: possiamo notare come, all'aumentare dei gradi di libertà, la funzione  $F$  di Fisher tende ad assomigliare sempre di più ad una normale.

### La distribuzione binomiale

Ogni esperimento per il quale ci siano solo due esiti possibili (successo ed insuccesso) e una certa probabilità di successo, viene detto **esperimento Bernoulliano**. Il tipico esempio è il lancio della moneta, nel quale possiamo ottenere solo testa o croce, con una probabilità di 0.5 (se la moneta non è truccata). In alcuni casi, potremmo avere una serie di esperimenti Bernoulliani indipendenti, con probabilità di successo costante (ad esempio, lanciare la moneta 10 volte) e potremmo essere interessati a conoscere la probabilità di ottenere  $k$  successi su  $n$  prove. Questa probabilità può essere descritta attraverso la **funzione di probabilità binomiale**.

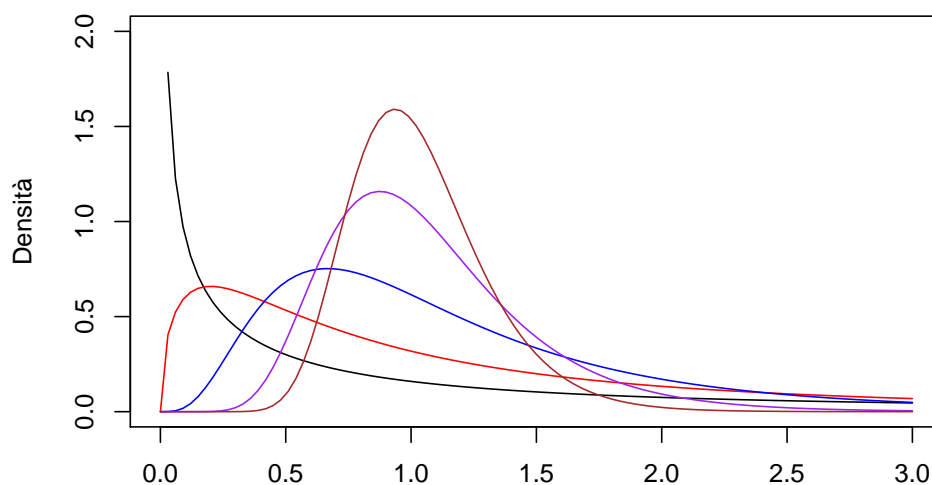


Figura 4.4: Distribuzioni F di Fisher, con  $u_1 = u_2 = u$  e  $u = 1$  (linea nera),  $u = 3$  (linea rossa),  $u = 10$  (linea blues),  $u = 30$  (linea violetta) e  $u = 60$  (linea marrone)

Poniamo di sapere che in una Facoltà di Agraria con un numero molto elevato di studenti, il rapporto tra maschi e femmine sia pari a 0.7 e quindi che la probabilità di incontrare un maschio sia pari a  $p = 0.7$  (evento semplice). Deve essere estratto a sorte un viaggio studio per quattro studenti e, per una questione di pari opportunità, si preferirebbe che fossero premiati in ugual misura maschi e femmine (cioè si vogliono premiare due femmine). Qual è la probabilità che un simile evento si realizzi?

La probabilità cercata si può ottenere pensando che abbiamo un evento “estrazione” che può dare due risultati possibili (maschio o femmina) e che deve essere ripetuto quattro volte. Se consideriamo “successo” estrarre una femmina, allora la probabilità di successo in ogni estrazione è  $p = 0.3$  mentre quella di insuccesso (evento complementare) è pari a  $1 - p = q = 0.7$ . Facciamo attenzione! Quanto abbiamo detto è vero solo se la popolazione è sufficientemente numerosa da pensare che la singola estrazione non cambia la probabilità degli eventi nelle successive (eventi indipendenti). La probabilità che su quattro estrazioni si abbiano 2 successi (due femmine) e due insuccessi (due maschi) è data da (teorema della probabilità composta):

$$0.3 \cdot 0.3 \cdot 0.7 \cdot 0.7 = 0.3^2 \cdot 0.7^2$$

In generale, data una popolazione molto numerosa, nella quale gli individui si presentano con due modalità possibili (in questo caso maschio e femmina)

e posto di sapere che la frequenza con cui si presenta la prima modalità è pari a  $p$  (in questo caso la frequenza delle femmine è pari a 0.3), mentre la frequenza della seconda modalità è pari a  $q = 1 - p$ , se vogliamo estrarre da questa popolazione  $n$  elementi, la probabilità che  $k$  di questi presentino la prima modalità (successo) è data da:

$$p^k \cdot q^{(n-k)}$$

La formula di cui sopra, tuttavia, non risolve il nostro problema, in quanto noi vogliamo che vengano estratte due femmine, indipendentemente dall'ordine con cui esse vengono estratte (prima, seconda, terza o quarta estrazione), mentre la probabilità che abbiamo appena calcolato è quella relativa all'evento in cui le due femmine sono estratte al primo e secondo posto.

Di conseguenza (teorema della probabilità totale), alla probabilità dell'evento indicato in precedenza (estrazione di due femmine in prima e seconda posizione) dobbiamo sommare la probabilità di tutti gli altri eventi utili (due femmine in seconda e terza posizione, oppure in terza e seconda, oppure in terza e quarta e così via). Il numero delle combinazioni possibili per 2 femmine in quattro estrazioni (combinazione di 4 elementi di classe 2) è dato dal coefficiente binomiale:

$$\binom{n}{k} = \frac{n!}{(n-k)!k!}$$

Moltiplicando le due equazioni date in precedenza otteniamo la funzione di probabilità binomiale:

$$P(X = x_i) = \frac{n!}{(n-k)!k!} \cdot p^k \cdot q^{(n-k)}$$

Nel caso specifico otteniamo il risultato:

$$P(X = 2) = \frac{4!}{(4-2)!2!} \cdot 0.3^2 \cdot 0.7^{(4-2)} = 0.2646$$

che è appunto la probabilità cercata.

In R, utilizziamo la funzione 'dbinom(successi, prove, probabilità semplice)' per calcolare la probabilità di ottenere  $k$  successi in  $n$  prove:

```
dbinom(2, 4, 0.3)
## [1] 0.2646
```

La funzione binomiale è un modello stocastico e si può dimostrare che il valore atteso (media) è uguale ad  $n \cdot p$ , mentre la varianza è pari a  $n \cdot p \cdot q$ :

La funzione di ripartizione (probabilità cumulata) si calcola in R con la funzione ‘pbinom(successi, prove, probabilità semplice)’. Nell’esempio, se vogliamo sapere la probabilità totale di estrarre meno di tre femmine (2 femmine o meno), possiamo operare in questo modo:

```
pbinom(2,4,0.3)
## [1] 0.9163
```

Che risulta anche dalla somma della probabilità di estrarre 0, 1, 2 femmine:

```
zero <- dbinom(0,4,0.3)
uno <- dbinom(1,4,0.3)
due <- dbinom(2,4,0.3)
zero + uno + due
## [1] 0.9163
```

La funzione di ripartizione può anche essere utilizzata al contrario, per determinare i quantili, cioè il numero di successi che corrispondono ad una probabilità cumulata pari ad alfa:

```
qbinom(0.9163,4,0.3)
## [1] 2
```

### 4.9.3 Altre letture

1. Bolker, B.M., 2008. Ecological models and data in R. Princeton University Press, Books.
2. Schabenberger, O., Pierce, F.J., 2002. Contemporary statistical models for the plant and soil sciences. Taylor & Francis, CRC Press, Books.

## Capitolo 5

### Stime ed incertezza

Abbiamo già visto che un esperimento scientifico non è altro che un'operazione di campionamento, con la quale io, invece che studiare una popolazione enorme di soggetti, posso studiarne un gruppo sufficientemente piccolo, e compatibile con le mie limitate risorse di tempo e denaro. Anche se il campione estratto è effettivamente rappresentativo della popolazione, rimane il fatto che esso è il risultato di uno solo degli infiniti sforzi di campionamento possibili. Con due importanti conseguenze:

1. le sue caratteristiche non necessariamente riflettono quelle della popolazione che lo ha generato;
2. campionamenti successivi forniscono risultati diversi, perché diversi sono i soggetti e, spesso, anche le condizioni in cui l'esperimento viene eseguito.

Di conseguenza, al di là del campione, il nostro interesse rimane fondamentalmente rivolto verso la popolazione che lo ha generato. Ci dobbiamo chiedere quale sia la relazione tra le caratteristiche del campione e quelle della popolazione da cui esso è estratto. Questo processo logico prende il nome di *inferenza statistica* e può essere condotto secondo le teorie di Karl Pearson (1857-1936), Egon Pearson (suo figlio: 1895-1980) e Jarzy Neyman (1894-1981), oltre al solito Ronald Fisher.

## 5.1 L'analisi dei dati: gli 'ingredienti' fondamentali

Richiamiamo il percorso logico che abbiamo introdotto nel capitolo precedente:

1. I fenomeni biologici seguono una legge di natura (verità 'vera'), che ne costituisce il meccanismo deterministico fondamentale.
2. Quando si organizza un esperimento, i soggetti sperimentali obbediscono a questo meccanismo di fondo, al quale tuttavia si sovrappongono molto altri elementi di 'confusione', altamente incontrollabili, che vanno sotto il nome di errore sperimentale.
3. L'osservazione sperimentale è quindi un'immagine confusa della verità vera e, soprattutto, l'osservazione sperimentale tende ad essere diversa per ogni sforzo di campionamento.
4. Compito del ricercatore è quello di separare l'informazione (che rappresenta la verità 'vera') dal 'rumore di fondo' provocato dall'errore sperimentale.

Questo dualismo tra verità 'vera' (inconoscibile) e verità sperimentale (esplorabile tramite un esperimento opportunamente pianificato) è l'aspetto centrale di tutta la biometria ed è schematizzato nella figura 5.1. Di esso abbiamo fatto menzione più volte nei capitoli precedenti.

In questo percorso logico ci sono due aspetti fondamentali che debbono essere attentamente valutati:

1. modello di generazione dei dati sperimentali;
2. sampling distribution (o sample space).

Chiariamo i due concetti con un esempio.

## 5.2 Esempio: una soluzione erbicida

Immaginiamo questa situazione: abbiamo una soluzione erbicida a concentrazione pari a  $120 \text{ mg/l}$ , che viene misurata tramite un gascromatografo. Lo strumento di misura, unitamente a tutte le altre fonti ignote di errore, produce un coefficiente di variabilità del 10% (corrispondente ad una deviazione standard pari a  $12 \text{ mg/l}$ ). Facciamo le analisi in triplicato, come usuale per questo tipo di lavori.

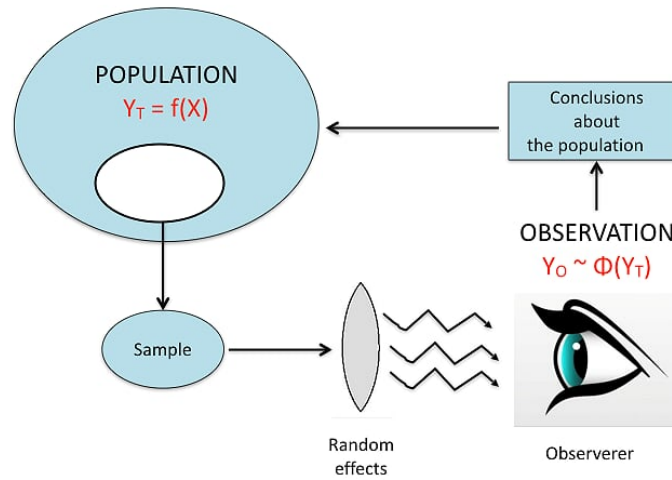


Figura 5.1: Osservazioni sperimentali e meccanismi perturbativi

### 5.2.1 Il modello dei dati

In primo luogo, ci chiediamo quale sia il modello matematico che genera le nostre osservazioni. Considerando quanto detto nel capitolo precedente, possiamo assumere che:

$$Y_i = \mu + \varepsilon_i$$

dove:

$$\varepsilon_i \sim N(\mu, \sigma)$$

cioè possiamo assumere che i risultati delle nostre misure siano normalmente distribuiti con media  $\mu = 120$  e deviazione standard  $\sigma = 12$ .

Con queste informazioni possiamo simulare un esperimento con R, ottenendo i seguenti risultati:

```
set.seed(1234)
Y <- rnorm(3, 120, 12)
Y
## [1] 105.5152 123.3292 133.0133
```

### 5.2.2 Analisi dei dati: stima dei parametri

Nelle due equazioni sovrastanti, gli elementi incogniti sono  $\mu$  e  $\sigma$ . In realtà, dato che si tratta di una simulazione, sappiamo che essi sono pari, rispettivamente, a 120 e 12; tuttavia, nella realtà questa informazione sarebbe totalmente sconosciuta. Guardando il campione, le nostre migliori stime  $\mu$  e  $\sigma$ , che chiameremo rispettivamente  $m$  ed  $s$ , sono pari rispettivamente alla media e alla deviazione standard del campione.

```
m <- mean(Y)
s <- sd(Y)
m; s
## [1] 120.6192
## [1] 13.9479
```

Questo processo con il quale assegniamo alla popolazione le caratteristiche del campione prende il nome di **stima puntuale** dei parametri. Vediamo ancora una volta che l'osservazione sperimentale non coincide con la verità 'vera' ( $m \neq \mu$  e  $s \neq \sigma$ ), ma non siamo molto distanti, considerando il 10% di variabilità dello strumento di analisi. Tuttavia, visto che dobbiamo trarre conclusioni che riguardano la popolazione e non il campione, è giustificato da parte nostra un atteggiamento prudentiale: prima di dire che la concentrazione erbicida nella soluzione è pari 120.6192187, dobbiamo chiederci: che cosa succederebbe se ripetessimo l'esperimento molte altre volte?

### 5.2.3 La 'sampling distribution'

In questo caso l'esperimento è solo 'elettronico' e possiamo quindi ripeterlo un numero anche molto elevato di volte, seguendo questa procedura:

1. Ripetiamo l'estrazione precedente per 100'000 volte (ripetiamo l'analisi chimica per 100'000 volte, sempre con tre repliche)
2. Otteniamo 100'000 medie
3. Calcoliamo la media delle medie e la deviazione standard delle medie

```
# Simulazione MONTE CARLO - Esempio 1
set.seed(1234)
result <- rep(0, 100000)
for (i in 1:100000){
  sample <- rnorm(3, 120, 12)
  result[i] <- mean(sample)
}
```



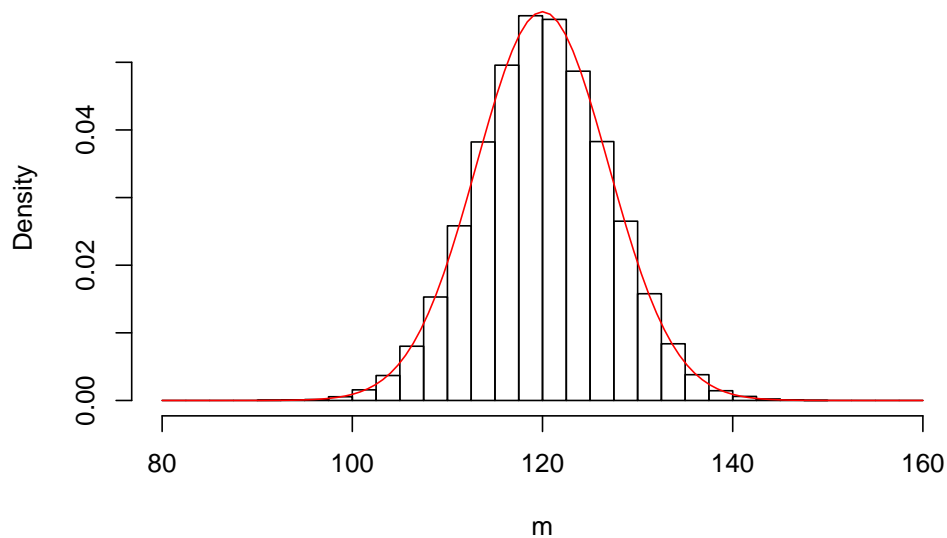


Figura 5.2: Sampling distribution empirica e teorica

```
mean(result)
## [1] 120.0341
sd(result)
## [1] 6.939063
```

In sostanza, la simulazione Monte Carlo ci consente di fare quello che dovremmo sempre fare, cioè ripetere l'esperimento un numero di volte molto elevato, anche se finito (un numero infinito è chiaramente impossibile!). A questo punto abbiamo in mano una popolazione di medie, che viene detta **sampling distribution**, un 'oggetto' abbastanza 'teorico', ma fondamentale per la statistica frequentista, perché caratterizza la variabilità dei risultati di un esperimento, e quindi la sua riproducibilità.

Notiamo che:

1. La media delle medie è praticamente coincidente con  $\mu$ , la verità 'vera'. Ciò conferma che l'unico modo di ottenere risultati totalmente precisi è ripetere infinite volte l'esperimento;
2. La deviazione standard delle medie è pari a 6.939063. Questo valore prende il nome di **errore standard** della media (SEM).

Esploriamo meglio la *sampling distribution*. Con R possiamo provare a discretizzarla e a riportarla su di un grafico a barre (figura 5.2 ).

### 5.2.4 L'errore standard

La *sampling distribution* che abbiamo ottenuto con la simulazione Monte Carlo è puramente empirica. Sarebbe interessante capire con più esattezza se esista una funzione di densità che permetta di descriverla con esattezza. In effetti, il grafico precedente mostra che la *sampling distribution* assomiglia molto ad una distribuzione normale, con media pari a 120 e deviazione standard pari all'errore standard.

Formalmente, il problema si può risolvere grazie alla legge di propagazione degli errori, che stabilisce tre importanti elementi:

1. Se ho due variabili normalmente distribuite e le sommo tra di loro, la variabile risultante è ancora normale. Se ho una variabile normalmente distribuita e la moltiplico per una costante, la variabile risultante è ancora normale.
2. Per variabili indipendenti, la varianza della somma è uguale alla somma delle varianze.
3. La varianza del prodotto di una variabile per una costante  $k$  è pari alla varianza della variabile originale moltiplicata per  $k^2$ .

Consideriamo che, quando preleviamo alcuni individui da una popolazione, ognuno di essi porta con sé una sua componente di incertezza, che egli 'eredita' dalla popolazione di cui fa parte. In questo caso, la popolazione ha una varianza pari a  $12^2 = 144$  e quindi ognuno dei tre soggetti campionati eredita tale varianza. Quando calcolo la media di tre osservazioni, in prima battuta io le sommo. A questo punto, dato che si tratta di osservazioni indipendenti, la propagazione degli errori (punto 2) ci dice che la varianza della somma è uguale a  $144 \times 3 = 432$ .

Dopo aver sommato, il calcolo della media richiede che il risultato venga diviso per 3. La legge di propagazione degli errori (punto 3) ci dice quindi che la varianza viene divisa per  $3^2 = 9$ . Insomma la popolazione delle medie è normale (punto 1), ha media pari a 120 e varianza pari a  $432/9 = 48$  e, di conseguenza, deviazione standard pari a  $\sqrt{48} = 6.928$ , cioè  $12/\sqrt{3}$ . In generale, l'errore standard di una media è:

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

dove  $n$  è la dimensione del campione.

### 5.3 Riepilogo 1: Caratterizzare l'incertezza di un esperimento

Che cosa ci insegna questo esperimento? Ci insegna che, se prendiamo una distribuzione normale con media  $\mu$  e deviazione standard  $\sigma$  e cominciamo ad estrarre campioni, le medie dei campioni sono variabili, secondo una distribuzione normale con media  $\mu$  e deviazione standard  $\sigma/\sqrt{n}$ . Questo concetto è interessante e può essere utilizzato per caratterizzare l'incertezza dei risultati di un esperimento. Riassumiamo:

1. Abbiamo fatto un esperimento con tre repliche campionando da una distribuzione normale incognita.
2. Abbiamo ottenuto i tre valori 105.5152, 123.3292 e 133.0133.
3. In base alle osservazioni in nostro possesso, concludiamo che la concentrazione erbicida è pari a  $m = 120.6192 \text{ mg/l}$ , con una deviazione standard pari a  $13.9479 \text{ mg/l}$ .
4. Dobbiamo adottare un atteggiamento prudentiale in relazione alla media, dato che non sappiamo il valore vero di  $\mu$ .
5. Immaginiamo di conoscere la sampling distribution, che avrà una deviazione standard pari a:

```
sd(Y) / sqrt(3)
## [1] 8.052824
```

6. Concludiamo quindi che  $\mu$  è pari a  $120.6192 \pm 8.053$

Abbiamo caratterizzato l'incertezza del risultato attraverso un intervallo di valori (**stima per intervallo**).

### 5.4 L'intervallo di confidenza

Sarebbe interessante poter rispondere a questa domanda: “qual è la proporzione di medie campionarie (cioè di ipotetici risultati del mio esperimento) che si trova all'interno della fascia di incertezza data?”. Un passo in avanti in questo senso è stato fatto da Neyman (1941), che propose di lavorare con la statistica  $T$ , definita come:

$$T = \frac{m - \mu}{\sigma_m}$$

dove  $\sigma_m$  è l'errore standard  $\sigma/\sqrt{n}$ . Se  $m$  è distribuito normalmente con media  $\mu$  e deviazione standard  $\sigma$ , la legge di propagazione degli errori ci dice che  $T$  è distribuito normalmente con media pari a  $m - \mu = 0$  e deviazione standard  $\sigma_m/\sigma_m = 1$ . Cioè la *sampling distribution* di  $T$  è una distribuzione normale standardizzata.<sup>1</sup>

Quindi possiamo scrivere:

$$P \left[ \text{qnorm}(0.025, 0, 1) \leq \frac{m - \mu}{\sigma_m} \leq \text{qnorm}(0.975, 0, 1) \right] = 0.95$$

cioè: esiste una probabilità pari a 0.95 che  $T = (m - \mu)/\sigma_m$  è compreso tra il 2.5-esimo e il 97.5-esimo percentile di una distribuzione normale standardizzata. E' facile vedere che:

```
qnorm(0.025, 0, 1)
## [1] -1.959964
qnorm(0.975, 0, 1)
## [1] 1.959964
```

Quindi, approssimando alla seconda cifra decimale:

$$P \left[ -1.96 \leq \frac{m - \mu}{\sigma_m} \leq 1.96 \right] = 0.95$$

Con semplici passaggi algebrici, possiamo ottenere l'intervallo di confidenza:

$$P[m - 1.96 \times \sigma_m \leq \mu \leq m + 1.96 \times \sigma_m] = 0.95$$

Proviamo a leggere l'espressione sovrastante: se prendiamo la stima  $m$  e il suo errore standard  $\sigma_m$  e calcoliamo un intervallo di confidenza come 1.96 volte l'errore standard, **esiste una probabilità pari a 0.95 che questo intervallo contenga  $\mu$ , cioè la media vera e ignota della popolazione**. In pratica, l'intervallo di confidenza potrebbe essere approssimato con il doppio dell'errore standard.

Il problema è che, nella pratica sperimentale,  $\sigma$  non è noto. Neyman propose di utilizzare  $s$  al posto di  $\sigma$ , cioè la deviazione standard del campione, invece

---

<sup>1</sup>Tra tutte le distribuzioni normali, ce n'è una particolare, che ha media 0 e deviazione standard 1. Questa si chiama **distribuzione normale standardizzata**

che quella della popolazione. Quindi, nel nostro caso, i limiti dell'intervallo di confidenza sono pari a:

```
m + qnorm(0.025) * s/sqrt(3)
## [1] 104.836
m + qnorm(0.975) * s/sqrt(3)
## [1] 136.4025
```

più semplicemente:

```
m + 2 * s/sqrt(3)
## [1] 136.7249
m + 2 * s/sqrt(3)
## [1] 136.7249
```

Questo che abbiamo calcolato è l'intervallo di confidenza per  $P = 0.95$ . Aumentando opportunamente il moltiplicatore possiamo calcolare gli intervalli di confidenza per  $P = 0.99$ ,  $P = 0.999$  e così via. Di fatto, l'intervallo di confidenza per  $P = 0.95$  è il più utilizzato in pratica.

## 5.5 Qual è il senso dell'intervallo di confidenza?

E' utile ricordare il nostro punto di partenza e il nostro punto di arrivo:

1. PUNTO DI PARTENZA: una distribuzione normale con  $\mu = 120$  e  $\sigma = 12$ . Nella realtà assumiamo che la distribuzione di partenza sia normale, mentre i suoi parametri sono totalmente ignoti.
2. PUNTO DI ARRIVO: una stima di  $\mu$  ed un intervallo di confidenza.

Che cosa significa questo intervallo? Esso fornisce:

1. una misura di precisione: più piccolo è l'intervallo, maggiore è la precisione della stima;
2. un'espressione di confidenza nel fatto che, se ripetessimo molte volte l'esperimento, nel 95% dei casi l'intervallo calcolato conterrebbe  $\mu$ .

Insomma, l'intervallo di confidenza serve ad esplicitare la nostra incertezza sulla media vera della popolazione in studio.

## 5.6 Come presentare i risultati degli esperimenti

Dopo aver letto questo capitolo e quelli precedenti, dovrebbe essere chiaro che la presenza dell'errore sperimentale crea incertezza in relazione alle caratteristiche della popolazione da cui abbiamo estratto il campione. Pertanto, è sempre obbligatorio associare alle nostre stime un indicatore di incertezza, la cui assenza non è, in linea di principio, accettabile. Possiamo considerare le seguenti possibilità:

1. riportare la media associata alla deviazione standard, per descrivere la variabilità originale del fenomeno in studio;
2. riportare la media associata all'errore standard, per descrivere l'incertezza associata alla stima della media;
3. riportare l'intervallo di confidenza ottenuto sottraendo/aggiungendo alla media il doppio dell'errore standard, per descrivere l'incertezza associata alla stima della media;

## 5.7 Alcune precisazioni

### 5.7.1 Campioni numerosi e non

Calcolare l'intervallo di confidenza utilizzando il doppio dell'errore standard costituisce un'approssimazione che è valida solo quando abbiamo esperimenti con un numero elevato di soggetti (maggiore di 15-20 circa). Per gli esperimenti piccoli, è necessario incrementare opportunamente il moltiplicatore. A questo fine viene utilizzato il valore corrispondente al 97.5-esimo percentile della distribuzione *t* di Student (non alla normale standardizzata, come abbiamo fatto finora), con un numero di gradi di libertà pari a quelli del campione studiato. Con tre soggetti il moltiplicatore sarebbe:

```
qt(0.975, 2)
## [1] 4.302653
```

Il moltiplicatore diminuisce all'aumentare della numerosità *e*, con 20 soggetti, diviene molto vicino a 2.

```
qt(0.975, 20)
## [1] 2.085963
```

Nel nostro esempio, con tre soggetti, l'intervallo di confidenza sarebbe:

```
m + qt(0.025, 2) * s/sqrt(3)
## [1] 85.97071
m + qt(0.975, 2) * s/sqrt(3)
## [1] 155.2677
```

Quindi, ben più alto di quello approssimato calcolato in precedenza. Chi ne volesse sapere di più, trova ulteriori informazioni in appendice.

### 5.7.2 Popolazioni gaussiane e non

In questo esempio siamo partiti da una popolazione con distribuzione gaussiana. In altri casi potrebbe non essere così. Ad esempio, immaginiamo di avere una popolazione di insetti, nella quale il rapporto tra maschi e femmine è ignoto. Campioniamo 40 insetti e contiamo 15 femmine. Qual è la proporzione di femmine nella popolazione originaria?

In questo caso stiamo studiando una grandezza che, almeno nel principio, non può essere gaussiana, ma è binomiale (vedi il capitolo precedente). Nonostante questo, possiamo utilizzare la stessa tecnica per la stima dell'intervallo di confidenza: sappiamo che la media di una distribuzione binomiale è  $p = 14/40 = 0.375$ , mentre la deviazione standard è  $\sigma = \sqrt{0.375 \times (1 - 0.375)} = 0.484$ . Di conseguenza, l'errore standard è  $0.484/\sqrt{40} = 0.077$ . L'intervallo di confidenza sarà dato quindi da:

```
0.375 - 2 * 0.077
## [1] 0.221
0.375 + 2 * 0.077
## [1] 0.529
```

Chi fosse interessato ad approfondire questi aspetti può proseguire nella lettura, dopo gli esercizi. Gli altri potranno fermarsi agli esercizi sottostanti.

## 5.8 Analisi statistica dei dati: riassunto del percorso logico

Considerando quanto finora detto, possiamo riassumere la logica dell'inferenza tradizionale nel modo seguente:

1. Un esperimento è solo un campione di un numero infinito di esperimenti simili che avremmo potuto/dovuto eseguire, ma che non abbiamo eseguito, per mancanza di risorse;
2. Assumiamo che i dati del nostro esperimento sono generati da un modello matematico probabilistico, che prende una certa forma algebrica e ne stimiamo i parametri utilizzando i dati osservati;
3. Costruiamo la sampling distribution per i parametri stimati o per altre statistiche rilevanti, in modo da caratterizzare i risultati delle infinite repliche del nostro esperimento, che avremmo dovuto fare, ma che non abbiamo fatto.
4. Utilizziamo la sampling distribution per l'inferenza statistica.

## 5.9 Da ricordare

1. La natura genera i dati
2. Noi scegliamo un modello deterministico che simula il meccanismo di generazione dei dati attuato dalla natura.
3. Stimiamo i parametri.
4. Confrontiamo le previsioni con i dati osservati. Determiniamo  $\epsilon$  e la sua deviazione standard ( $\sigma$ )
5. Assumiamo un modello stocastico ragionevole per spiegare  $\epsilon$ , quasi sempre di tipo gaussiano, con media 0 e deviazione standard pari a  $\sigma$ , indipendente dalla  $X$  (omoscedasticità)
6. Qualunque stima sperimentale deve essere associata ad un indicatore di variabilità (errore standard o intervallo di confidenza).

## 5.10 Esercizi

1. Un'analisi chimica è stata eseguita in triplicato, ottenendo i seguenti risultati: 125, 169 e 142 ng/g. Calcolare media, devianza, varianza, deviazione standard, coefficiente di variabilità ed errore standard.
2. Considerare il campione composto dai valori 140 - 170 - 155 e stimare i limiti di confidenza della media ( $P = 0.95$ ).
3. Un campione di 400 insetti a cui è stato somministrato un certo insetticida mostra che 136 di essi sono sopravvissuti. Determinare un intervallo di confidenza con grado di fiducia del 95% per la proporzione della popolazione insensibile al trattamento.



## 5.11 Per approfondire un po'...

## 5.12 *Coverage* degli intervalli di confidenza

Abbiamo visto che un metodo semplice per costruire un intervallo di confidenza è utilizzare il doppio dell'errore standard. Questo intervallo, se viene utilizzato come misura di precisione/incertezza, è sempre accettabile. Tuttavia, da un punto di vista strettamente probabilistico, è lecito chiedersi: ma è proprio vero che se io ripeto l'esperimento molte volte e calcolo sempre l'intervallo di confidenza, riesco a centrare la media  $\mu$  nel 95% dei casi? È bene sapere che, con termine inglese, l'effettiva percentuale di campioni per i quali l'intervallo di confidenza, calcolato per un certo  $P$  nominale (es.  $P = 0.95$ ), contiene effettivamente la media  $\mu$  della popolazione, viene detta *coverage*. Quindi la nostra domanda è: qual è il *coverage* dell'intervallo di confidenza calcolato con il doppio dell'errore standard?

Proviamo a rispondere a questa domanda con una simulazione Monte Carlo. Prendiamo la solita popolazione normalmente distribuita con  $\mu = 120$  e  $\sigma = 12$  ed estraiamo centomila campioni. Per ogni campione, calcoliamo l'intervallo di confidenza della media ( $P = 0.95$ ) considerando il doppio dell'errore standard. Verifichiamo poi se questo intervallo contiene il valore 120: se sì, assegniamo al campionamento il valore 1 (successo), altrimenti assegniamo il valore 0.

```
result <- rep(0, 100000)
set.seed(1234)
for (i in 1:100000){
  sample <- rnorm(3, 120, 12)
  limInf<- mean(sample) - sd(sample)/sqrt(3) * 2
  limSup<- mean(sample) + sd(sample)/sqrt(3) * 2
  if (limInf<= 120 & limSup>= 120) result[i] = 1
}
sum(result)/100000
## [1] 0.81708
```

La simulazione mostra che la risposta alla domanda precedente è no: il nostro intervallo di confidenza non è riuscito a centrare la media nel 95% dei casi; ciò è avvenuto in poco più dell'80% dei casi (*coverage* dell'81.7%, circa). In

realtà, possiamo facilmente verificare, con altre simulazioni di Monte Carlo, che il *coverage* si avvicina al 95% solo se abbiamo campioni di numerosità superiore a 15-20 circa.

```
result <- rep(0, 100000)
set.seed(1234)
for (i in 1:100000){
  n <- 15
  sample <- rnorm(n, 120, 12)
  limInf<- mean(sample) - sd(sample)/sqrt(n) * 2
  limSup<- mean(sample) + sd(sample)/sqrt(n) * 2
  if (limInf<= 120 & limSup>= 120) result[i] = 1
}
sum(result)/100000
## [1] 0.93594
```

Insomma, quando gli esperimenti sono piccoli, con poche repliche, dovremmo trovare un metodo di calcolo degli intervalli di confidenza un po' più affidabile, se veramente volessimo ottenere un *coverage* pari a quello nominale ( $P = 0.95$ ).

Il problema, già accennato, nasce dal fatto che  $\sigma_m$  viene sostituito con  $s_m$ , cioè il valore di errore standard stimato nel campione. Come tutte le stime, anche  $s_m$  è soggetto ad incertezza, il che aggiunge un elemento ulteriore di imprecisione nella sampling distribution di  $T$ . Insomma ci chiediamo, la *sampling distribution* di  $T$ , calcolata con  $s$  invece che  $\sigma$  è ancora normale? Verifichiamo questo aspetto empiricamente, con una nuova simulazione Monte Carlo. Questa volta facciamo la seguente operazione:

1. campioniamo tre individui
2. Calcoliamo il valore di  $T$  con la statistica precedente, utilizzando la deviazione standard del campione e lo salviamo
3. Con un po' di pazienza, ripetiamo il tutto 100'000 volte.

```
#SIMULAZIONE MONTE CARLO - t di Student
set.seed(435)
result <- c()
for (i in 1:100000){
  sample3 <- rnorm(3, 120, 12)
  Ti <- (mean(sample3) - 120) / (sd(sample3)/sqrt(3))
  result[i] <- Ti
}
```

Se riportiamo i valori ottenuti su una distribuzione di frequenze otteniamo il grafico in Figura 5.3.

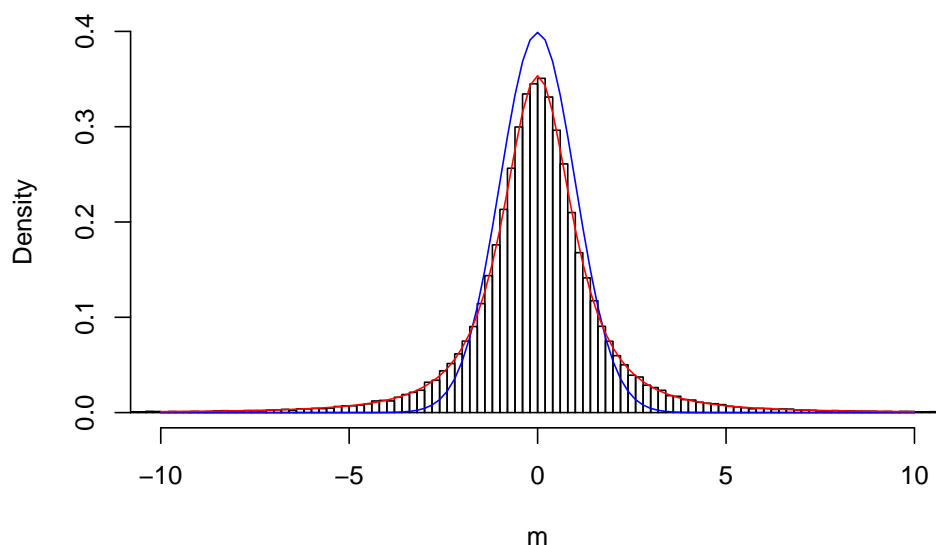


Figura 5.3: Sampling distribution empirica per le medie campionarie, insieme ad una distribuzione gaussiana (blue) e t di Student con 2 gradi di libertà (rossa)

```
b <- seq(-600, 600, by=0.2)
hist(result, breaks = b, freq=F, xlab = expression(paste(m)), ylab="Density", xlim=c(-
curve(dnorm(x, 0, 1), add=TRUE, col="blue")
curve(dt(x, 2), add=TRUE, col="red")
```

Vediamo che la *sampling distribution* di  $T$ , determinata utilizzando  $s$  invece che  $\sigma$  è solo approssimativamente normale. E' facile vedere che questa approssimazione è sufficientemente buona solo se la numerosità del campione diviene abbastanza grande (es.  $n > 30$ ), ma non certamente quando  $n = 3$ . In questo caso, la *sampling distribution* che osserviamo è più 'dispersa' di quella normale, con un maggior numero di valori sulle code.

Neyman scoprì che la sampling distribution di  $T$  poteva essere perfettamente descritta utilizzando la distribuzione t di Student, con un numero di gradi di libertà pari a quelli del campione (in questo caso 2), come vediamo nella figura 5.3. In realtà questa conclusione era stata già raggiunta da William Sealy Gosset (1876 - 1937), uno statistico impiegato presso la fabbrica londinese della famosa birra Guinness, dove elaborava i dati relativi all'andamento del processo di maltazione. Egli, avendo definito questa nuova funzione di densità, per aggirare il divieto di pubblicazione imposto dal suo datore di lavoro, pubblicò i risultati sotto lo pseudonimo Student, da cui deriva il nome della distribuzione di densità.

Quindi, quando i campioni sono piccoli, il modo giusto di calcolare l'intervallo di confidenza è quello di utilizzare l'espressione seguente:

$$P(m + qt(0.025, n - 1) \cdot s_m \leq \mu \leq m + qt(0.975, n - 1) \cdot s_m) = 0.95$$

dove  $qt(0.025, n - 1)$  e  $qt(0.975, n - 1)$  sono rispettivamente il 2.5-esimo e il 97.5-esimo percentile della distribuzione t di Student, con  $n-1$  gradi di libertà.

E' facile osservare che, se l'intervallo di confidenza è calcolato in questo modo, il suo *coverage* effettivo è pari al 95%.

```
result <- rep(0, 100000)
set.seed(1234)
for (i in 1:100000){
  sample <- rnorm(3, 120, 12)
  limInf<- mean(sample) + sd(sample)/sqrt(3) * qt(0.025, 2)
  limSup<- mean(sample) + sd(sample)/sqrt(3) * qt(0.975, 2)
  if (limInf<= 120 & limSup>= 120) result[i] = 1
}
sum(result)/100000
## [1] 0.94936
```

Tuttavia, la formula di Neyman, anche se assicura un *coverage* pari a quello nominale, si presta a cattive letture, che sono insensate da un punto di vista probabilistico, ma tuttavia molto frequenti nella pratica operativa. Ad esempio, immaginiamo di aver effettuato un campionamento dalla nostra popolazione con  $\mu = 120$  e  $\sigma = 12$ . Il risultato è:

```
set.seed(1234)
x <- rnorm(3, 120, 12)
m <- mean(x)
s <- sd(x)
m; s
## [1] 120.6192
## [1] 13.9479
```

Di conseguenza, l'intervallo di confidenza va da 85.9707117 a 155.2677256

1. **NON E' VERA** l'affermazione che: *c'è il 95% di probabilità che la media 'vera' sia tra 85.0 e 155.3*. La media vera della popolazione è sempre fissa e pari a 120 e non cambia seguendo una distribuzione di probabilità. L'affermazione probabilistica deve essere riferita alla

possibilità che l'intervallo di confidenza la centri, non al valore della media.

2. **E' DUBBIA** l'affermazione che: *c'è il 95% di probabilità che l'intervallo di confidenza contenga  $\mu$* . In questa affermazione, la probabilità è legata all'intervallo di confidenza, ma l'affermazione è ugualmente sbagliata se si riferisce al singolo campionamento. Infatti, il singolo e specifico intervallo di confidenza (86.0 - 155.3) può contenere o no  $\mu$ , ma non abbiamo alcun elemento per sapere se effettivamente lo contiene, neanche in termini di probabilità. Invece l'affermazione è corretta se si riferisce al futuro, cioè alle ipotetiche repliche dell'esperimento.
3. **NON E' VERA:** l'affermazione che *ripetendo infinite volte l'esperimento, il 95% delle stime che otteniamo cadono nell'intervallo 86.0 e 155.3*. Una semplice simulazione mostra che tutte le medie campionate cadono in quell'intervallo

```
result <- rep(0, 100000)
set.seed(1234)
for (i in 1:100000){
  sample <- rnorm(3, 120, 12)
  if (mean(sample) <= 155.0 & mean(sample) >= 85.3) result[i] = 1
}
sum(result)/100000
## [1] 1
```

Insomma, l'intervallo di confidenza vale per la sampling distribution e non vale per ogni singolo campionamento (esperimento). L'unica cosa che possiamo lecitamente affermare è che, se ripetessimo l'esperimento un numero molto elevato di volte e calcolassimo l'intervallo di confidenza sempre con la formula di Neyman, nel 95% dei casi saremmo in grado di 'catturare' la media vera della popolazione all'interno del nostro intervallo di confidenza, che diviene in questo modo una sorta di polizza assicurativa, per contenere la nostra probabilità d'errore, nel lungo periodo, al disotto del 5%.

### 5.12.1 Intervalli di confidenza per fenomeni non-normali

Nel sottocapitolo precedente abbiamo presentato un esempio in cui avevamo campionato da una distribuzione normale, riscontrando una *sampling distribution* per la media campionaria anch'essa normale (almeno approssimativamente). Ma che succede se la distribuzione di partenza è non-normale? La *sampling distribution* di uno stimatore è ancora normale? Vediamo un nuovo esempio.

Immaginiamo di avere 4'000'000 di semi ben mischiati (in modo che non ci siano raggruppamenti non casuali di qualche tipo), che costituiscono la nostra popolazione di partenza. Vogliamo appurare la frequenza relativa ( $p$ ) dei semi dormienti. Questa informazione, nella realtà, esiste ( $\pi = 0.25$ ), ma non è nota.

Dato l'elevato numero di 'soggetti', non possiamo testare la germinabilità di tutti i semi, ma dobbiamo necessariamente prelevare un campione casuale di 40 soggetti; ogni seme viene saggiato e, dato che la popolazione è molto numerosa, l'estrazione di un seme non modifica sensibilmente la proporzione di quelli dormienti nella popolazione (esperimenti indipendenti).

Dopo aver descritto la popolazione e l'esperimento, ci chiediamo quale sia il modello matematico che genera i nostri dati (numero di successi su 40 semi estratti). Il disegno sperimentale ci assicura che ogni estrazione è totalmente indipendente dalla precedente e dalla successiva ed ha due soli risultati possibili, cioè successo (seme dormiente), o insuccesso (seme germinabile). Di conseguenza, ogni singola estrazione si configura come un esperimento Bernoulliano, con probabilità di successo pari a  $\pi$ , il cui valore 'vero' esiste, è fisso, pre-determinato (esiste ancor prima di organizzare l'esperimento), anche se incognito e in conoscibile, a meno di non voler/poter esaminare tutti i semi disponibili. L'insieme delle 40 estrazioni (40 esperimenti Bernoulliani) può produrre un ventaglio di risultati possibili, da 40 successi a 40 insuccessi, per un totale di 41 possibili 'outcomes'.

E' evidente che i 41 possibili risultati non sono ugualmente probabili e si può dimostrare che la probabilità di ottenere  $k$  successi (con  $k$  che va da 0 ad  $n$ ;  $n$  è al numero delle estrazioni) dipende da  $\pi$  ed è descrivibile matematicamente con la distribuzione binomiale  $\phi$ :

$$\phi(k, n, p) = \frac{n!}{(n-k)!k!} p^k (1-p)^{(n-k)}$$

Abbiamo quindi definito il modello matematico che descrive la probabilità di tutti i possibili risultati del nostro esperimento e quindi può in qualche modo essere considerato il 'meccanismo' che 'genera' i dati sperimentali osservati. Si tratta di un meccanismo puramente 'stocastico' nel quale è solo il caso che, attraverso il campionamento, determina il risultato dell'esperimento.

Con queste informazioni, possiamo simulare un esperimento con R, ottenendo i seguenti risultati:

```
set.seed(236)
rbinom(1, 40, 0.25)
## [1] 9
```

Abbiamo ottenuto 9 successi su 40, cioè 9 semi dormienti su 40 saggiati. La proporzione osservata è  $p = 9/40 = 0.225$ . Concludiamo (stima puntuale) che  $\pi = 0.225$ . Anche in questo caso vi è chiara discrasia tra la verità ‘vera’ e l’osservazione sperimentale (tra  $\pi$  e  $p$ ).

Cosa succede se ripetiamo l’esperimento? Come abbiamo imparato a fare, possiamo cercare una risposta attraverso la simulazione Monte Carlo, ricorrendo ad un generatore di numeri casuali da una distribuzione binomiale con  $n = 40$  e  $\pi = 0.25$  (in R si usa la funzione ‘rbinom(numeroDatiCasuali, n, p)’). Il codice è più semplice, in quanto non è necessario impostare un ciclo iterativo:

```
set.seed(1234)
result <- rbinom(10000000, 40, 0.25)
```

Esploriamo i risultati ottenuti:

```
result_p <- result/40
mean(result_p)
## [1] 0.2499795
sd(result_p)
## [1] 0.06849423
```

Osserviamo subito che, anche se i singoli esperimenti portano a stime diverse da  $\pi$  vero, la media di  $p$  tende ad essere uguale a  $\pi$ . L’errore standard (deviazione standard della *sampling distribution*) è 0.0685. Fino a qui, non vi è nulla di diverso dall’esempio precedente, se teniamo presente che la deviazione standard della popolazione originale (che è binomiale) è pari a  $\sqrt{p \times (1 - p)}$ , quindi l’errore standard è  $\sqrt{0.25 \times 0.75/40} = 0.0685$ .

Rimane da stabilire se la *sampling distribution* di  $p$  è normale. Possiamo utilizzare i 10’000’000 di valori ottenuti per costruire una distribuzione empirica di frequenze, come nel codice sottostante.

```
breaks <- seq(0, 0.7, by=0.025)
freqAss <- as.numeric( table(cut(result_p, breaks) ) )
freqRel <- freqAss/length(result_p)
density <- freqRel/0.025
p_oss <- breaks[2:length(breaks)]
```

La distribuzione empirica della proporzione campionaria è visibile in Figura @rif(fig:figName2541).

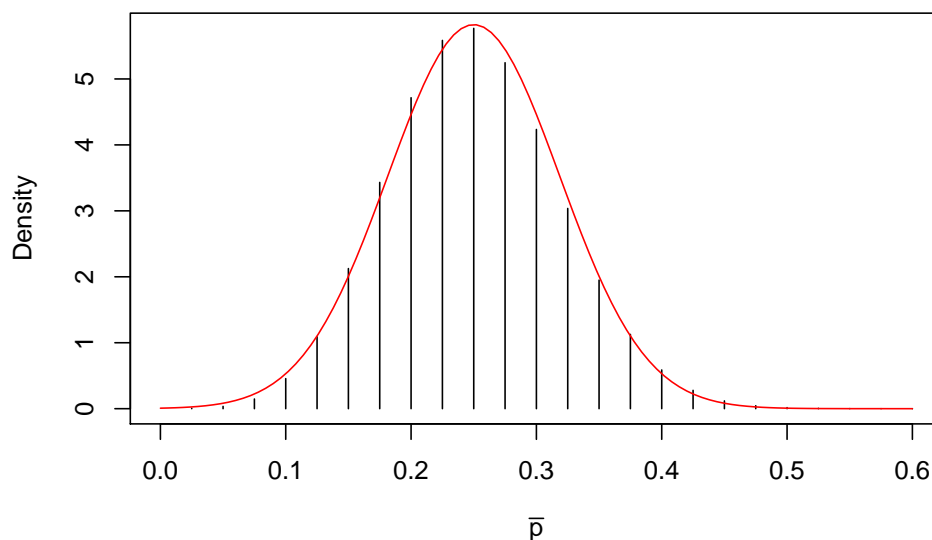


Figura 5.4: Sampling distribution per le proporzioni campionarie

```
plot(density ~ p_oss, type = "h",
     xlab = expression(paste(bar(p))),
     ylab="Density",
     xlim=c(0,0.6) )
b <- seq(0, 1, by=0.1)
curve(dnorm(x, 0.25, 0.0685), add=TRUE, col="red")
```

Vediamo che *sampling distribution* è approssimativamente normale con media pari a 0.25 e deviazione standard pari a 0.0685. Lo percepiamo chiaramente dal grafico soprastante, ma c'è una spiegazione scientifica per questo, basata sul **TEOREMA DEL LIMITE CENTRALE**:

1. La sampling distribution di una statistica ottenuta da campioni casuali e indipendenti è approssimativamente normale, indipendentemente dalla distribuzione della popolazione da cui i campioni sono stati estratti.
2. La media della sampling distribution è uguale al valore della statistica calcolata sulla popolazione originale, la deviazione standard della sampling distribution (errore standard) è pari alla deviazione standard della popolazione originale divisa per la radice quadrata della numerosità di un campione.



### 5.12.2 Altre letture

1. Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J., 2009. The elements of statistical learning, Springer Series in Statistics. Springer Science + Business Media, California, USA.

# Capitolo 6

## Decisioni e incertezza

Nel capitolo precedente abbiamo visto come è possibile esprimere l'incertezza che il campionamento e, in genere, l'errore sperimentale producono sulle nostre stime. In particolare, abbiamo visto che, per una certa statistica rilevata su un campione, è possibile utilizzare la *sampling distribution* (o *sample space* o *distribuzione campionaria*), con un procedimento che prende il nome di inferenza statistica (stima per intervallo). Analogamente, la *sampling distribution* può essere utilizzata per prendere decisioni in presenza di incertezza, con un procedimento che si chiama test d'ipotesi. Anche in questo capitolo, vediamo alcuni esempi, partendo da quello già esposto in precedenza.

### 6.1 Confronto tra una media osservata e una media teorica

Nel capitolo precedente, abbiamo misurato la concentrazione di una soluzione erbicida tramite un gascromatografo. Facendo l'analisi in triplicato, abbiamo ottenuto i tre valori riportati di seguito.

## [1] 105.5152 123.3292 133.0133

Abbiamo calcolato la media, la deviazione standard, l'errore standard e l'intervallo di confidenza. Ora immaginiamo che esista un livello soglia pari a 200 mg/l, al disopra del quale il prodotto diviene tossico per i mammiferi. Dato che non conosciamo il vero valore di  $\mu$  ci chiediamo: *è possibile che le nostre tre repliche, nella realtà, provengano da una popolazione che ha media uguale a 200?*

In questo caso sappiamo bene che non è possibile, visto che abbiamo generato i dati sperimentali (vedi il capitolo precedente), tramite simulazione Monte Carlo, partendo da una verità vera nota ( $\mu = 120$  e  $\sigma = 12$ ); tuttavia, nella realtà, la domanda è lecita.

Potremmo formalizzare la nostra domanda mediante un'ipotesi scientifica, detta *ipotesi nulla* ( $H_0$ ), per la quale assumiamo che  $\mu = 200$ . Scriviamo:

$$H_0 : \mu = 200$$

Cerchiamo ora di vedere quanto la nostra osservazione è 'discrepanza' rispetto all'ipotesi nulla.

In particolare, possiamo calcolare una statistica, che abbiamo già utilizzato per l'intervallo di confidenza, in grado di misurare questa discrepanza:

$$T = \frac{m - 200}{s_m}$$

Il valore da noi osservato è:

```
Ti <- (m - 200)/sm
Ti
## [1] -9.857508
```

il che implica un certo grado di discrepanza, altrimenti avremmo dovuto osservare un valore di  $T$  più vicino a 0. **Possiamo affermare che ciò sia imputabile solo alla variabilità di campionamento e che quindi il nostro esperimento confermi l'ipotesi nulla ( $\mu = 200$ )?**

È evidente che l'ipotesi nulla, oltre che come l'abbiamo scritta più sopra, potrebbe anche essere posta come:

$$H_0 : T = 0$$

Oltre all'ipotesi nulla, dobbiamo anche definire l'ipotesi alternativa semplice (a 'due code'), che potrebbe essere:

$$H_1 : T \neq 0$$

E' possibile anche definire ipotesi alternative complesse del tipo:

$$H_1 : T < 0$$

oppure:

$$H_1 : T > 0$$

Bisogna ricordare che le ipotesi debbono essere stabilite prima di effettuare l'esperimento. In questo caso abbiamo fatto un campionamento e abbiamo trovato un valore (120.619) inferiore a quello atteso (200). Che cosa ci attendevamo prima di fare l'esperimento? Ci attendevamo un valore diverso da 200, ma non avevamo informazioni per immaginare se avrebbe potuto essere maggiore o minore? In questo caso l'ipotesi alternativa dovrebbe essere la prima (quella semplice). Avevamo invece ragionevoli motivi per ritenere che  $m$  avrebbe potuto essere inferiore, ma non superiore a 200? In questo caso l'ipotesi alternativa potrebbe essere la seconda (ipotesi alternativa complessa). Propendiamo per quest'ultima ipotesi, cioè  $\mu < 200$ .

Siamo in totale coerenza con la logica Galileiana: abbiamo un'ipotesi di partenza e un esperimento, col quale eventualmente rigettare questa ipotesi, per abbracciarne una alternativa. Fisher, negli anni 20 del 1900, propose di utilizzare come **'forza dell'evidenza scientifica' la probabilità di ottenere un risultato uguale o più estremo di quello osservato, calcolato supponendo vera l'ipotesi nulla**. Penso che il modo migliore di spiegare questo concetto è attraverso l'esempio pratico.

### 6.1.1 Simulazione Monte Carlo

Supponiamo che l'ipotesi nulla sia vera. È evidente che, se prendiamo una popolazione gaussiana con  $\mu = 200$ , cominciamo ad estrarre campioni e, per ognuno di essi, calcoliamo  $T$ , otterremo un 'ventaglio di valori, che danno origine ad una *sampling distribution*. Ci chiediamo: come è fatta questa *sampling distribution*?

La cosa migliore è costruirla con una simulazione Monte Carlo, ripetendo molte volte (es. 100'000) l'estrazione di campioni con numerosità pari a 3, da una distribuzione normale con media pari a 200 e deviazione standard pari a 13.948. Utilizziamo questo valore di deviazione standard perché è quello osservato nel campione e, nella realtà, sarebbe l'unico valore disponibile, dato che non sapremmo nulla della popolazione originale. Per eseguire questa operazione utilizziamo il seguente codice R:

```

set.seed(1234)
result <- rep(0, 100000)
for (i in 1:100000){
  sample <- rnorm(3, 200, s)
  result[i] <- (mean(sample) - 200) / (sd(sample)/sqrt(3))
}

```

In questo modo otteniamo 100'000 valori di  $T$  e possiamo calcolare la proporzione di questi che è pari o inferiore al valore da noi osservato (1):

```

pLev <- length(result[result < Ti])/100000
pLev
## [1] 0.00517

```

Eseguendo questa simulazione, otteniamo una proporzione di valori pari a 0.00517. Il risultato si riassume dicendo che il P-level per l'ipotesi nulla è pari a 0.00517. La regola di condotta della statistica tradizionale è quella di rigettare l'ipotesi nulla quando il P-level è inferiore ad una certa soglia prefissata (normalmente  $P \leq 0.05$ ). Di conseguenza, concludiamo che vi sono elementi sufficienti per rifiutare l'ipotesi che il valore incognito della concentrazione di erbicida sia pari a 200 mg/l. Infatti, se l'ipotesi nulla fosse vera, avremmo osservato qualcosa di estremamente improbabile.

In altre parole, l'evidenza scientifica è sufficientemente buona per il rifiuto dell'ipotesi nulla, anche se esiste una certa probabilità d'errore, pari appunto alla probabilità che l'ipotesi nulla sia vera ( $P = 0.00517$ ).

### 6.1.2 Soluzione formale

Possiamo definire una distribuzione di frequenze per  $T$ ? Empiricamente possiamo osservare che, analogamente al caso degli intervalli di confidenza, la distribuzione di riferimento non è normale, bensì  $t$  di Student, con due gradi di libertà. Analogamente al caso degli intervalli di confidenza, la gaussiana è una buona approssimazione solo se il campione è molto numeroso o se  $\sigma$  della popolazione è noto.

```

#Sampling distribution per T
max(result);min(result)
## [1] 545.0709
## [1] -594.9397
b <- seq(-600, 600, by=0.25)
hist(result, breaks = b, freq=F,
      xlab = expression(paste(m)), ylab="Density",

```

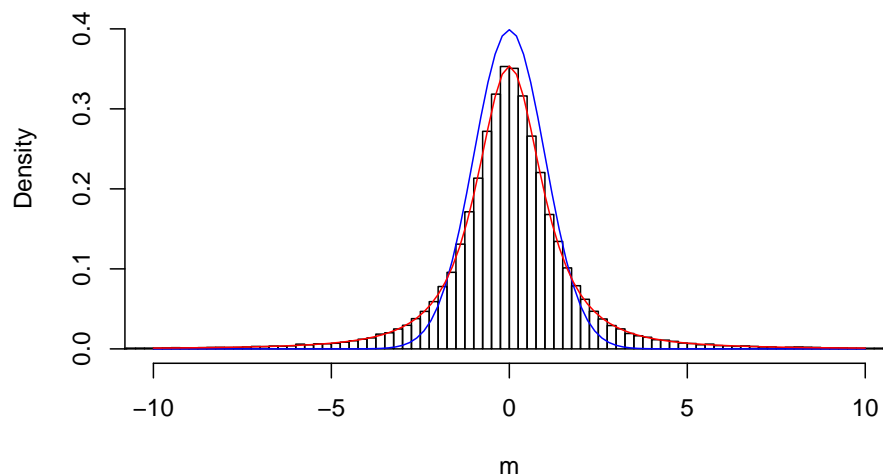


Figura 6.1: Sampling distribution empirica a confronto con una distribuzione normale (in rosso) e una distribuzione t di Student con due gradi di libertà

```
xlim=c(-10,10), ylim=c(0,0.45), main="")
curve(dnorm(x), add=TRUE, col="blue")
curve(dt(x, 2), add=TRUE, col="red")
```

Senza ricorrere alla simulazione Monte Carlo, possiamo quindi risolvere il problema utilizzando la distribuzione t di Student, nella quale cercheremo la probabilità di ottenere valori di T minori o uguali a quello da noi osservato:

```
pt(Ti, df=2)
## [1] 0.005067503
```

dove gli argomenti indicano rispettivamente il valore osservato. Il P-level è molto simile a quello ottenuto con la simulazione Monte Carlo.

Allo stesso valore, più semplicemente, si giunge utilizzando la funzione “t.test()”:

```
t.test(Y, mu=200, alternative="less")
##
## One Sample t-test
##
## data: Y
## t = -9.8575, df = 2, p-value = 0.005068
## alternative hypothesis: true mean is less than 200
## 95 percent confidence interval:
## -Inf 144.1333
## sample estimates:
```

```
## mean of x  
## 120.6192
```

### 6.1.3 Interpretazione del P-level

Quando il P-level è inferiore a 0.05, concludiamo che vi sono prove scientifiche sufficientemente forti per rifiutare la nostra ipotesi di partenza.

Bisogna sottolineare come il P-level nella statistica tradizionale sia stato inizialmente proposto da Fisher come criterio di comportamento e non come un vero e proprio criterio inferenziale-probabilistico. Successivamente, Jarzy Neyman ed Egon Pearson, intorno al 1930, proposero di utilizzare il P-level come probabilità di errore di I specie, cioè come probabilità di rifiutare erroneamente l'ipotesi nulla. Tuttavia, trattandosi di una probabilità calcolata a partire da una *sampling distribution*, cioè da un'ipotetica infinita ripetizione dell'esperimento, essa non ha alcun valore in relazione al singolo esperimento effettivamente eseguito, come i due autori menzionati in precedenza hanno esplicitamente chiarito.

Di conseguenza, nel caso in esempio, affermare che abbiamo una probabilità di errore pari a 0.0051 nel rifiutare l'ipotesi nulla, rappresenterebbe un abuso: le nostre conclusioni potrebbero essere false o vere, ma non abbiamo alcun elemento per scegliere tra le due opzioni. Possiamo solo affermare che, se ripetessimo infinite volte l'esperimento e se l'ipotesi nulla fosse vera, otterremmo un risultato estremo come il nostro o più estremo solo in 5 casi (circa) su 1000. In altre parole, nel lungo periodo, basando le nostre conclusioni sul criterio anzidetto (rifiuto l'ipotesi nulla se il P-value è inferiore a 0.05) commettiamo un errore in non più del 5% dei casi. Insomma, il P-level non può essere guardato come la probabilità di 'falso-positivo' ad ogni singolo test, ma solo nel lunghissimo periodo.

## 6.2 Confronto tra due medie: il test t di Student

Un ricercatore ha scelto casualmente dieci piante da una popolazione; ne ha trattate cinque con l'erbicida A e cinque con il placebo P. Alla fine dell'esperimento ha determinato il peso di ognuna delle dieci piante. E' evidente che le piante in prova sono solo un campione di quelle possibili, così come è evidente che il peso, come ogni altra variabile biologica, è soggetto ad una

certa variabilità naturale, legata sia a questioni genotipiche che fenotipiche, oltre che ad eventuali errori casuali di misura.

I risultati sono i seguenti:

```
A <- c(65, 68, 69, 71, 78)
```

```
P <- c(80, 81, 84, 88, 94)
```

Nel campione A la media è pari a 70.2, mentre la deviazione standard è pari a 4.87. L'errore standard è pari a 2.18 e quindi l'intervallo di confidenza della media è  $70.2 \pm 6.04$ . Invece, nel campione P, la media è 85.4, mentre la deviazione standard è pari a 5.72. L'errore standard è pari a 2.56, mentre l'intervallo di confidenza per la media è  $85.4 \pm 7.11$ .

Possiamo affermare che l'erbicida A riduce il peso delle piante trattate, coerentemente con le aspettative riguardo ad una molecola di questo tipo? Nel rispondere a questa domanda bisogna tener presente che i campioni sono totalmente irrilevanti, dato che il nostro interesse è rivolto alle popolazioni che hanno generato i campioni. Vogliamo cioè che le nostre conclusioni abbiano carattere di universalità e non siano specifiche a quanto abbiamo osservato nel nostro esperimento. Intanto possiamo notare che il limite di confidenza superiore per A ( $70.2 + 6.04 = 76.24$ ) è inferiore al limite di confidenza inferiore per P ( $75.4 - 7.11 = 68.29$ ). Questo non è un criterio sul quale basare le nostre considerazioni, ma è comunque un segno che le popolazioni da cui provengono i due campioni potrebbero essere diverse.

Per trovare un criterio decisionali più rigoroso, possiamo formulare **l'ipotesi nulla in questi termini**:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu$$

In altre parole, la nostra ipotesi di lavoro è che i due campioni siano in realtà estratti da due distribuzioni normali con la stessa media e la stessa deviazione standard, il che equivale a dire che essi provengono da un'unica distribuzione normale con media  $\mu$  e deviazione standard  $\sigma$ .

L'ipotesi alternativa semplice può essere definita:

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

Se avessimo elementi sufficienti già prima di effettuare l'esperimento (e non dopo aver visto i risultati), potremmo anche adottare ipotesi alternative complesse, del tipo



$$H_1 : \mu_1 > \mu_2$$

oppure:

$$H_1 : \mu_1 < \mu_2$$

Quale statistica potrebbe meglio descrivere l'andamento dell'esperimento, in relazione all'ipotesi nulla? E' evidente che questa statistica dovrebbe essere basata su due indicatori diversi:

1. l'entità della differenza tra le medie: più la differenza tra le due medie è alta e più è probabile che essa sia significativa;
2. l'entità dell'errore standard. Più è elevata la variabilità dei dati (e quindi l'errore di stima) più è bassa la probabilità che le differenze osservate tra le medie siano significative.

Su queste basi, si può individuare la seguente statistica:

$$T = \frac{m_1 - m_2}{SED}$$

Si può osservare che  $T$ , in realtà, non è altro che il rapporto tra le quantità indicate in precedenza ai punti 1 e 2: infatti la quantità al numeratore è la differenza tra le medie dei due campioni, mentre la quantità al denominatore è il cosiddetto errore standard della differenza tra due medie (SED). Quest'ultima quantità si può ottenere pensando che i due campioni sono estratti in modo indipendente e, pertanto, la varianza della somma (algebrica) è uguale alla somma delle varianze. La varianza delle due medie è data dal quadrato delle loro deviazioni standard, cioè dal quadrato degli errori standard (SEM). Pertanto:

$$SED^2 = SEM_1^2 + SEM_2^2$$

Sappiamo anche che il SEM si ottiene dividendo la deviazione standard di ogni campione per la radice quadrata del numero dei dati, quindi:

$$SED^2 = \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}$$

cioè:

$$SED = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

Possiamo anche scrivere:

$$SED = \sqrt{\frac{s_1^2 n_2 + s_2^2 n_1}{n_1 n_2}}$$

e, se le varianze sono uguali ( $s_1^2 = s_2^2 = s^2$ ), segue che:

$$SED = \sqrt{s^2 \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$$

Se fosse anche  $n_1 = n_2 = n$ , potremmo scrivere:

$$SED = \sqrt{2 \frac{s^2}{n}} = \sqrt{2} \times SEM$$

Il valore osservato per T è quindi uguale a:

$$T = \frac{85.4 - 70.2}{3.361547} = 4.5217$$

dove il denominatore è ottenuto come:

$$SED = \sqrt{2.18^2 + 2.56^2} = 3.361547$$

A questo punto avendo osservato  $T = 4.5217$ , possiamo chiederci: qual è la ‘sampling distribution’ per T, cioè quali valori potrebbe assumere questa statistica se ripetessimo il campionamento infinite volte, assumendo che l’ipotesi nulla fosse vera?

La sampling distribution per T potrebbe essere ottenuta empiricamente, utilizzando una simulazione Monte Carlo. Il codice da utilizzare per questa simulazione è fornito in appendice, dove si può vedere che, formalmente, la sampling distribution per T è una distribuzione t di Student, con 8 gradi di libertà (quattro per campione). Siamo quindi in grado di calcolare la probabilità di ottenere valori di T altrettanto estremi o più estremi di quello da noi osservato, tenendo però presente che il test è ‘a due code’. Infatti,

il  $T$  osservato è positivo, ma solo perché abbiamo scritto la differenza come  $m_2 - m_1$  invece che come  $m_1 - m_2$ . Tuttavia, entrambe le differenze sono possibili, quindi dobbiamo considerare anche il valore reciproco  $-T$ . In altre parole, ci chiediamo qual è la possibilità di campionare da una distribuzione  $t$  di Student valori esterni all'intervallo  $(-4.5217; 4.5217)$ . La risposta, con  $R$ , è piuttosto semplice da ottenere:

```
2 * pt(-4.5217, 8, lower.tail=T)
## [1] 0.00194554
```

Abbiamo moltiplicato per 2 il risultato, in quanto la funzione `dt()` fornisce la probabilità di trovare individui inferiori a  $-4.5217$  (`lower.tail = T`). Essendo la distribuzione simmetrica, la probabilità di trovare soggetti superiori a  $4.5217$  è esattamente la stessa.

Vediamo che il  $P$ -level è minore di  $0.05$  e possiamo quindi rifiutare l'ipotesi nulla. Concludiamo che vi è un'evidenza scientifica abbastanza forte per ritenere che l'erbicida  $A$  induca una riduzione del peso delle piante trattate.

Allo stesso valore, più semplicemente, si perviene utilizzando la funzione:

```
t.test(A, P, var.equal=T)
##
## Two Sample t-test
##
## data: A and P
## t = -4.5217, df = 8, p-value = 0.001945
## alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -22.951742 -7.448258
## sample estimates:
## mean of x mean of y
##      70.2      85.4
```

Gli argomenti della funzione `t.test()` sono i due vettori e l'argomento `var.equal`, che in questo caso è stato settato su `TRUE`. Chi volesse comprendere meglio il motivo di questa specifica, può leggerlo in appendice, alla fine del capitolo. Per gli altri, precisiamo solo che il test di  $t$  così eseguito è valido quando i due campioni sono indipendenti ed estratti da distribuzioni gaussiane con la stessa varianza. Queste assunzioni, soprattutto la seconda, sono sostenibili solo se le varianze osservate per i due campioni sono molto simili, con una differenza al di sotto di un ordine di grandezza, come accade nel nostro esempio.

### 6.3 Confronto tra due proporzioni: il test $\chi^2$

Il test di t è molto utile, ma soltanto nel caso in cui si abbia a che fare con caratteri quantitativi, cioè con variabili misurate su una scala continua, per le quali sia possibile calcolare statistiche descrittive, come appunto la media. Talvolta, i ricercatori sono interessati a rilevare caratteristiche qualitative, come ad esempio lo stato di una pianta in seguito ad un trattamento (morta o viva), il colore dei semi (si ricordino i piselli verdi e gialli di Mendel) ed altre caratteristiche che non sono misurabili su una scala continua.

Avendo a che fare con variabili qualitative, l'unica statistica rilevabile è il numero di soggetti che presentano le diverse modalità. Ad esempio, immaginiamo un esperimento per verificare se un coadiuvante aumenta l'efficacia di un insetticida. In questo esperimento, utilizziamo l'insetticida da solo e miscelato con il coadiuvante su due gruppi di insetti diversi. Nel primo gruppo (trattato con insetticida) contiamo 56 morti su 75 insetti trattate, mentre nel secondo gruppo (trattato con insetticida e coadiuvante) otteniamo 48 morti su 50 insetti trattati.

I risultati di questo esperimento si riducono ad una tabella di contingenza:<sup>1</sup>

```
counts <- c(56, 19, 48, 2)
tab <- matrix(counts, 2, 2, byrow = T)
row.names(tab) <- c("I", "IC")
colnames(tab) <- c("M", "V")
tab
##      M  V
## I   56 19
## IC  48  2
```

Per una tabella di contingenza, possiamo determinare una statistica che misura la connessione tra variabili (trattamento e mortalità), detta  $\chi^2$ . La connessione è l'indicatore giusto per rispondere alla nostra domanda di ricerca; infatti ci stiamo chiedendo se la proporzione dei morti è indipendente dal tipo di trattamento oppure no.

Con R, il  $\chi^2$  si calcola applicando la funzione `summary` all'oggetto 'data.table'. Dato che la nostra tabella 'tab' è, in realtà, una matrice (alme-

---

<sup>1</sup>da Wikipedia: *Le tabelle di contingenza sono un particolare tipo di tabelle a doppia entrata (cioè tabelle con etichette di riga e di colonna), utilizzate in statistica per rappresentare e analizzare le relazioni tra due o più variabili. In esse si riportano le frequenze congiunte delle variabili*

no così come l'abbiamo creata), prima di interrogarla con il metodo 'summary()' dobbiamo trasformarla in un oggetto 'data.table', con la funzione 'as.table()':

```
summary( as.table(tab) )
## Number of cases in table: 125
## Number of factors: 2
## Test for independence of all factors:
##  Chisq = 9.768, df = 1, p-value = 0.001776
```

Il valore di  $\chi^2$  osservato è pari a 9.768, il che indica un certo grado di connessione. Infatti, ricordiamo che, in caso di indipendenza tra le variabili,  $\chi^2$  dovrebbe essere zero. Tuttavia, noi non siamo interessati ai due campioni, in quanto i 125 soggetti osservati sono tratti da due popolazioni più ampie. Considerando queste due popolazioni, poniamo l'ipotesi nulla in questi termini:

$$H_o : \pi_1 = \pi_2 = \pi$$

Vediamo che, come negli altri esempio, l'ipotesi nulla riguarda i parametri delle popolazioni ( $\pi_1$  e  $\pi_2$ ), non quelli dei campioni ( $p_1$  e  $p_2$ ). Ci chiediamo: se l'ipotesi nulla è vera ( $\pi_1 = \pi_2$ ), qual è la sampling distribution per  $\chi^2$ ? E soprattutto, quanto è probabile ottenere un valore alto come il nostro o più alto?

In appendice mostriamo come si possa arrivare a questo risultato con una simulazione Monte Carlo. In modo formale, si può dimostrare che, se  $n$  è sufficientemente grande ( $n > 30$ ), il valore osservato di  $\chi^2$  segue appunto la distribuzione di probabilità  $\chi^2$ , con un numero di gradi di libertà  $\nu$  pari al numero dei dati indipendenti, che, in questo caso, è pari ad 1. Infatti, una volta fissata una frequenza, le altre sono automaticamente definite, dovendo restituire i totali marginali. In R, possiamo utilizzare la funzione 'pchis()' per calcolare la probabilità di ottenere valori pari o superiori a 9.768:

```
pchisq(9.76801, 1, lower.tail=F)
## [1] 0.001775746
```

Allo stesso risultato, ma in modo più semplice, è possibile pervenire utilizzando la già citata funzione 'summary()', applicata alla tabella di contingenza (vedi sopra), oppure:

```
chisq.test(tab, correct = F)
##
##  Pearson's Chi-squared test
```

```
##  
## data:  tab  
## X-squared = 9.768, df = 1, p-value = 0.001776
```

Come nel caso del ‘t’ di Student, abbiamo diversi tipi di test di chi quadro. In particolare, possiamo applicare o no la correzione per la continuità, che è necessaria quando il numero dei soggetti è piccolo (minore di 30, grosso modo),. Nel nostro caso, non lo abbiamo ritenuto necessario ed abbiamo quindi aggiunto l’argomento ‘correct = F’.

## 6.4 Conclusioni

Abbiamo visto quale strumento abbiamo a disposizione per tirare conclusioni in presenza di incertezza sperimentale. Dovrebbe essere evidente che anche le nostre conclusioni sono incerte, in quanto soggette all’errore di campionamento. In particolare, abbiamo visto che esiste un rischio di errore di prima specie, cioè rifiutare erroneamente l’ipotesi nulla (falso positivo). Allo stesso modo, esiste anche un rischio di errore di II specie, cioè accettare erroneamente l’ipotesi nulla (falso negativo). Di questi due tipi di errore abbiamo parlato più diffusamente in appendice.

## 6.5 Riepilogo

Lo schema di lavoro, nel test d’ipotesi, è il seguente:

1. Si formula l’ipotesi nulla;
2. Si individua una statistica che descriva l’andamento dell’esperimento, in relazione all’ipotesi nulla;
3. Si individua la sampling distribution per questa statistica, assumendo vera l’ipotesi nulla; la sampling distribution può essere empirica (ottenuta per simulazione) o teorica, scelta in base a considerazioni probabilistiche
4. Si calcola la probabilità che, essendo vera l’ipotesi nulla, si possa osservare un valore altrettanto estremo o più estremo di quello calcolato, per la statistica di riferimento;
5. Se il livello di probabilità è inferiore ad una certa soglia  $\alpha$  prefissata (generalmente 0.05), si rifiuta l’ipotesi nulla.

## 6.6 Esercizi

1. Uno sperimentatore ha impostato un esperimento verificare l'effetto di un fungicida (A) in confronto al testimone non trattato (B), in base al numero di colonie fungine sopravvissute. Il numero delle colonie trattate è di 200, con 180 colonie sopravvissute al trattamento. Il numero di quelle non trattate è di 100, con 50 colonie sopravvissute. Stabilire se i risultati possono essere considerati significativamente diversi, per un livello di probabilità del 5%
2. Uno sperimentatore ha impostato un esperimento per confrontare due tesi sperimentali (A, B). Per la tesi A sono stati osservati le seguenti produzioni: 9.3, 10.2, 9.7. Per la tesi B, sono stati osservati valori di 12.6, 12.3 e 12.5. Stabilire se i risultati possono essere considerati significativamente diversi, per un livello di probabilità del 5%.
3. Uno sperimentatore ha impostato un esperimento per confrontare se l'effetto di un fungicida è significativo, in un disegno sperimentale con tre ripetizioni. Con il trattamento, i risultati produttivi (in t/ha) sono 65, 71 e 68. Con il non trattato, i risultati sono 54, 51 e 59. E' significativo l'effetto del trattamento fungicida sulla produzione, per un livello di probabilità di errore del 5%?
4. Immaginate di aver riscontrato che, in determinate condizioni ambientali, 60 olive su 75 sono attaccate da *Daucus oleae* (mosca dell'olivo). Nelle stesse condizioni ambientali, diffondendo in campo un insetto predatore siamo riusciti a ridurre il numero di olive attaccate a 12 su 75. Si tratta di una oscillazione casuale del livello di attacco o possiamo concludere che l'insetto predatore è stato un mezzo efficace di lotta biologica alla mosca dell'olivo?

---

## 6.7 Per approfondire un po'...

### 6.7.1 Tipologie alternative di test t di Student

Chiunque abbia utilizzato un computer per eseguire un test di t, si sarà accorto che è necessario scegliere tra tre procedure alternative. Infatti, abbiamo:

1. t-test appaiato. In questo caso le misure sono prese a coppia sullo stesso soggetto e non sono quindi indipendenti.
2. t-test omoscedastico. Le misure sono prese su soggetti diversi (indipendenti) e possiamo supporre che i due campioni provengano da due popolazioni con la stessa varianza.
3. t-test eteroscedastico. Le misure sono prese su soggetti diversi, ma le varianze non sono omogenee.

Consideriamo i due campioni:

```
C1
## [1] 12.660770  9.947017 10.500794 13.471233 13.459139
C2
## [1] 16.14014 16.20918 12.96391 15.51307 14.91213
mean(C1)
## [1] 12.00779
mean(C2)
## [1] 15.14769
var(C1)
## [1] 2.798071
var(C2)
## [1] 1.767402
```

Vediamo che le medie sono diverse ma le varianze sono simili, dello stesso ordine di grandezza. Pertanto, possiamo utilizzare un test t omoscedastico, che garantisce un più alto livello di potenza.

```
t.test(C1, C2, var.equal = T, paired = F)
##
## Two Sample t-test
##
## data:  C1 and C2
## t = -3.2859, df = 8, p-value = 0.01109
## alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -5.3434208 -0.9363712
## sample estimates:
## mean of x mean of y
## 12.00779 15.14769
```

Consideriamo invece quest'altra coppia di campioni:

```
D1
## [1] 12.06608 11.79470 11.85008 12.14712 12.14591
D2
```



```
## [1] 35.14014 35.20918 31.96391 34.51307 33.91213
mean(D1)
## [1] 12.00078
mean(D2)
## [1] 34.14769
var(D1)
## [1] 0.02798071
var(D2)
## [1] 1.767402
```

In questo caso le varianze sono molto diverse e l'assunzione di omoscedasticità non è tenibile. Dobbiamo utilizzare un test eteroscedastico e, di conseguenza, mentre il SED si calcola con la formula esposta più sopra, si pone il problema di stabilire il numero di gradi di libertà del SED stesso. Dato che il sed è ottenuto come somma di varianze, il numero di gradi di libertà può essere approssimato con la formula di Satterthwaite:

$$DF_s \simeq \frac{(s_1^2 + s_2^2)^2}{\frac{(s_1^2)^2}{DF_1} + \frac{(s_2^2)^2}{DF_2}}$$

Vediamo che se le varianze e i gradi di libertà sono uguali, la formula precedente riduce a:

$$DF_s = 2 \times DF$$

Nel nostro caso:

```
dfS <- (var(D1) + var(D2))^2 /
  ((var(D1)^2)/4 + (var(D2)^2)/4)
dfS
## [1] 4.126621
```

In effetti:

```
t.test(D1, D2, var.equal=F)
##
## Welch Two Sample t-test
##
## data: D1 and D2
## t = -36.959, df = 4.1266, p-value = 2.326e-06
## alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -23.79070 -20.50312
```

```
## sample estimates:
## mean of x mean of y
## 12.00078 34.14769
```

Se le misure in D1 e D2 fossero state rilevate sugli stessi soggetti (due misure per soggetto), allora avremmo cinque soggetti invece che dieci e, di conseguenza solo 4 gradi di libertà:

```
t.test(D1, D2, var.equal=F, paired=T)
##
## Paired t-test
##
## data: D1 and D2
## t = -38.002, df = 4, p-value = 2.864e-06
## alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -23.76497 -20.52885
## sample estimates:
## mean of the differences
## -22.14691
```

### 6.7.2 Simulazione del P-value nel test d'ipotesi

Più sopra abbiamo visto che il test d'ipotesi viene eseguito sulla base del principio che, quando l'ipotesi nulla è vera, una statistica campionaria ( $T$ ,  $\chi^2$  o altro) mostra una certa variabilità tra un campionamento e l'altro. Quando i campionamenti sono tanti (meglio, infiniti), i valori ottenuti danno origine ad una *sampling distribution*, che può essere modellizzata utilizzando una qualche distribuzione di probabilità formale, come il  $t$  di Student il chi quadro e così via.

Invece che ricorrere ad una distribuzione di probabilità nota, possiamo costruire una *sampling distribution* empirica, utilizzando le simulazioni Monte Carlo. In questo caso, il campionamento viene ripetuto molte volte, assumendo che l'ipotesi nulla sia vera. Mostriamo ora come questo approccio possa essere utilizzato per confrontare due medie oppure due proporzioni campionarie.

Immaginiamo di avere i due campioni, A e P, indicati in precedenza, con un  $T$  osservato pari a -4.521727. Se i due campioni fossero estratti dalla stessa popolazione normale, questa dovrebbe avere una media pari a  $(70.2 + 85.4)/2 = 77.8$  e una deviazione standard pari alla deviazione standard

delle dieci osservazioni (tutte insieme, senza distinzioni di trattamento), cioè 9.45.

```
media <- mean(c(A, P))
devSt <- sd(c(A, P))
media
## [1] 77.8
devSt
## [1] 9.44928
```

Proviamo ora ad utilizzare un generatore di numeri casuali gaussiani per estrarre numerose (100'000) coppie di campioni, e calcolare, per ogni coppia, il valore  $T$ , come abbiamo fatto con la nostra coppia iniziale.

Il codice da utilizzare in R per le simulazioni è il seguente:

```
T_obs <- -4.521727
set.seed(34)
result <- rep(0, 100000)
for (i in 1:100000){
  sample1 <- rnorm(5, media, devSt)
  sample2 <- rnorm(5, media, devSt)
  SED <- sqrt( (sd(sample1)/sqrt(5))^2 +
               (sd(sample2)/sqrt(5))^2 )
  result[i] <- (mean(sample1) - mean(sample2)) / SED
}

length(result[result < T_obs]) / 100000
## [1] 0.00095
length(result[result > - T_obs]) / 100000
## [1] 0.00082
```

Possiamo notare che, dei 100'000 valori di  $T$  osservati assumendo vera l'ipotesi nulla, meno dell'un per mille sono inferiori a quello da noi osservato e altrettanti sono superiori al suo reciproco (4.5217). In totale, la probabilità di osservare un valore di  $T$  così alto in valore assoluto è dello 0.18 %, molto simile a quella ottenuta più sopra con il test  $t$  di Student.

E se dobbiamo confrontare due proporzioni? Prendiamo la tabella di contingenze utilizzata più sopra:

```
tab
##      M  V
## I   56 19
## IC  48  2
```

La connessione si esprime con la statistica chi quadro e il valore osservato è 9.768. Qual è la probabilità che, se i caratteri sono indipendenti, si produca un valore di chi quadro pari o superiore a 9.768?

Per la simulazione possiamo utilizzare la funzione `'r2dtable()'`, che produce il numero voluto di tabelle di contingenza, con righe e colonne indipendenti, rispettando i totali marginali voluti. Le tabelle prodotte (nel nostro caso 10'000) sono restituite come lista, quindi possiamo utilizzare la funzione `'lapply()'` per applicare ad ogni elemento della lista la funzione che restituisce il  $\chi^2$  (`'chiSim'`).

```
chiSim <- function(x) summary(as.table(x))$stat
set.seed(1234)
tabs <- r2dtable(10000, apply(tab, 1, sum), apply(tab, 2, sum))
chiVals <- as.numeric( lapply( tabs, chiSim) )
length(chiVals[chiVals > 9.768])
## [1] 19
```

Vediamo che vi sono 19 valori più alti di quello da noi osservato, quindi il p-value è 0.0019. Anche in questo caso molto simile a quello ottenuto con un test statistico formale.

### 6.7.3 Altre letture

1. Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J., 2009. The elements of statistical learning, Springer Series in Statistics. Springer Science + Business Media, California, USA.

## Capitolo 7

# Modelli ANOVA ad una via

Nel capitolo 4 abbiamo già parlato di come assumiamo che risultati di un esperimento si generino attraverso un doppio meccanismo deterministico e stocastico, rappresentabile attraverso un modello matematico contenente uno o più elementi casuali, descritti da una funzione di densità, solitamente gaussiana. Abbiamo già visto che i modelli più utilizzati sono lineari e, tra questi, il gruppo più diffuso, almeno in ambito biologico-agrario, è quello dei modelli ANOVA.

La nomenclatura è impropria; infatti, con il termine ANOVA, si intende un'operazione di scomposizione della varianza, inventata da Fisher negli anni '30 del '900, che costituisce ancora oggi una delle più fondamentali tecniche di analisi dei dati sperimentali. Tuttavia, ci sono alcuni modelli che, più naturalmente di altri, sono connessi all'esecuzione dell'ANOVA fisheriana. Si tratta di modelli lineari nei quali la/le variabile/i indipendenti, che descrivono gli stimoli sperimentali, sono nominali (categoriche) e, nella letteratura anglosassone, prendono il nome di 'factors' (fattori sperimentali).

Questi modelli rappresentano il punto di ingresso nell'analisi dei dati e la gran parte della letteratura scientifica è basata proprio su questi modelli. Pertanto, ad essi dedicheremo ampio spazio nel seguito di questo libro.

## 7.1 Caso-studio: confronto tra erbicidi in vaso

Abbiamo eseguito un esperimento in vaso, nel quale abbiamo utilizzato quattro trattamenti erbicidi:

1. Metribuzin
2. Rimsulfuron
3. Metribuzin + rimsulfuron
4. Testimone non trattato

Lo scopo dell'esperimento era quello di verificare se la miscela metribuzin e rimsulfuron è più efficace dei due componenti utilizzati separatamente. L'esperimento era disegnato a randomizzazione completa con quattro repliche e prevedeva il rilievo della biomassa presente su ogni vaso, tre settimane dopo il trattamento: un più basso valore di biomassa implica un miglior effetto del trattamento.

I risultati di questo esperimento sono riportati nel dataset 'mixture.csv', che è disponibile su [gitHub](#). Per prima cosa, carichiamo il file.

```
str1 <- "https://raw.githubusercontent.com/OnofriAndreaPG"
str2 <- "/agroBioData/master/mixture.csv"
pathData <- paste(str1, str2, sep = "")

dataset <- read.csv(pathData, header = T)
head(dataset)
##           Treat Weight
## 1      Unweeded  24.62
## 2      Unweeded  30.94
## 3      Unweeded  24.02
## 4      Unweeded  27.51
## 5 Metribuzin__348  15.20
## 6 Metribuzin__348   4.38
```

Il dataset è organizzato come un database, nel quale ogni riga contraddistingue un'unità sperimentale (record) e ogni colonna rappresenta una caratteristica del record (campo). In questo caso abbiamo due colonne: una per la variabile indipendente (fattore sperimentale 'Treat'), che ci dice con quale erbicida è stata trattata ogni unità sperimentale, ed una per la variabile dipendente ('Weight').

## 7.2 Descrizione del dataset

La prima analisi dei dati consiste nella valutazione descrittiva del dataset. In particolare, calcoliamo:

1. le medie per ogni tesi sperimentale
2. Le deviazioni standard per ogni tesi sperimentale

Utilizziamo la funzione ‘tapply’ in R.

```
medie <- tapply(dataset$Weight, dataset$Treat, mean)
SDs <- tapply(dataset$Weight, dataset$Treat, sd)
descrip <- cbind(medie, SDs)
descrip
##               medie      SDs
## Metribuzin__348  9.1750 4.699089
## Mixture_378      5.1275 2.288557
## Rimsulfuron_30   16.8600 4.902353
## Unweeded         26.7725 3.168673
```

Che cosa ci dice questa tabella, in base agli obiettivi dell’esperimento?

Ci suggerisce che:

1. La miscela sembra leggermente più efficace dei prodotti singoli
2. Esiste una certa variabilità (errore sperimentale), che impedisce un giudizio certo
3. La variabilità è abbastanza simile per tutti i trattamenti

## 7.3 Definizione di un modello lineare

Sappiamo che, dietro ai campioni osservati, vi sono una o più popolazioni di riferimento, alle quali è rivolto il nostro interesse: abbiamo infatti osservato  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  ed  $m_4$  (le medie dei campioni), ma siamo effettivamente interessati a conoscere  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\mu_3$  e  $\mu_4$ , cioè le medie delle popolazioni da cui i campioni sono tratti. E siamo anche interessati a capire se la differenza è sufficientemente ampia da poter ritenere che non sia di natura puramente casuale.

Per descrivere le osservazioni possiamo utilizzare un modello lineare del tipo:

$$Y_i = \mu + \alpha_j + \varepsilon_i$$

Questo modello impone che le osservazioni  $Y$  derivino da un valore  $\mu$ , detto intercetta, a cui si aggiunge l'effetto del trattamento  $\alpha_j$  e l'effetto stocastico  $\varepsilon$ , che è un elemento che influenza ogni singola osservazione  $i$ .

Il valore atteso per un soggetto, in assenza di errore sperimentale, è:

$$\bar{Y}_i = \mu + \alpha_j$$

È abbastanza facile intuire che, se non ci fosse l'errore sperimentale, un soggetto dovrebbe avere un valore pari alla media del gruppo di cui fa parte, per cui:

$$\bar{Y}_i = \mu_j = \mu + \alpha_j$$

## 7.4 Parametrizzazione del modello

Gli elementi  $\mu$  ed  $\alpha$  hanno un significato diverso a seconda della **parametrizzazione del modello**. Infatti, dobbiamo tener presente che, con il modello lineare sopra riportato, ci stiamo proponendo di ottenere la quantità  $Y_i$  come somma di tre valori ed, in questi termini, il problema è indeterminato. Infatti esistono infinite triplette di valori che, sommati, possono restituire  $Y_i$ , qualunque esso sia. Per questo motivo dobbiamo porre un qualche vincolo su uno degli elementi in gioco. Esistono diversi tipi di vincoli, ma, in questo testo, ne tratteremo solo due, quelli più rilevanti.

### 7.4.1 Vincolo sul trattamento

Un vincolo molto usato è  $\alpha_1 = 0$ . Di conseguenza, risulta che:

$$\begin{cases} \mu_1 = \mu + \alpha_1 = \mu + 0 \\ \mu_2 = \mu + \alpha_2 \\ \mu_3 = \mu + \alpha_3 \\ \mu_4 = \mu + \alpha_4 \end{cases}$$



quindi  $\mu$  è la media del primo trattamento, usualmente inteso in ordine alfabetico (ma il riferimento può cambiare, a seconda delle esigenze). Gli altri valori  $\alpha_j$ , sono differenze tra le medie dei gruppi da 2 a 4 con la media del gruppo 1.

In generale, adottando il vincolo sul trattamento, i parametri sono medie, valori attesi oppure differenze tra medie e/o differenze tra valori attesi.

### 7.4.2 Vincolo sulla somma

Un altro possibile vincolo consiste nell'imporre che la somma degli  $\alpha_j$  sia pari a 0. In questo caso, abbiamo quattro gruppi, quindi quattro medie. Se prendiamo l'espressione precedente e sommiamo membro a membro, otteniamo:

$$\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 = 4\mu + \sum \alpha_j$$

Quindi, con il vincolo sulla somma:

$$\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 = 4\mu$$

Quindi:

$$\mu = \frac{\mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4}{4}$$

cioè  $\mu$  è la media generale e  $\alpha_j$  rappresentano gli scostamenti di ogni trattamento rispetto alla media generale, usualmente definiti **effetti dei trattamenti**. Se un prodotto è efficace, abbasserà di più il peso delle infestanti e quindi avrà un elevato effetto negativo.

La seconda parametrizzazione è forse più 'comprensibile' e, se il disegno è bilanciato, è abbastanza facile stimare i parametri 'a mano', utilizzando il metodo dei momenti, a partire dalle medie aritmetiche dei trattamenti.

I software statistici, invece, non utilizzano il metodo dei momenti, ma scelgono i valori dei parametri ai quali corrisponde il minimo valore della somma dei quadrati dei residui (metodo dei minimi quadrati). Solitamente utilizzano di default la parametrizzazione con vincolo sul trattamento, anche se questa impostazione, se necessario, può essere cambiata.

Indipendentemente dalla parametrizzazione prescelta, i valori attesi, e quindi i residui, sono gli stessi; l'errore sperimentale viene assunto gaussiano e omoscedastico, cioè la varianza è unica ed uguale per tutte le tesi:

$$\varepsilon_i \sim N(0, \sigma)$$

## 7.5 Assunzioni di base

In questa costruzione algebrica abbiamo implicitamente posto alcuni ‘punti fermi’, detti **assunzioni di base**, che sono i seguenti:

1. la componente deterministica è lineare e additiva
2. non vi sono altri effetti, se non il trattamento e l'errore, che è puramente stocastico, senza componenti sistematiche
3. gli errori sono campionati in modo indipendente, da una distribuzione normale, con media 0 e deviazione standard  $\sigma$
4. le varianze sono omogenee (unico valore di  $\sigma$ , comune per tutti i gruppi)

È evidente che il nostro dataset deve conformarsi a queste nostre aspettative, altrimenti il modello è invalido. Ci occuperemo di questa verifica nel prossimo capitolo.

## 7.6 Stima dei parametri

### 7.6.1 Coefficienti del modello

Iniziamo il nostro lavoro di inferenza con la stima dei parametri. Dato che il disegno è bilanciato (stesso numero di repliche per trattamento), la stima dei parametri può essere fatta a mano, a partire dalle medie aritmetiche dei trattamenti e dalla media generale (metodo dei momenti). Avendo scelto di imporre un vincolo sul trattamento ( $\alpha_1 = 0$ ), i valori dei parametri possono essere così ottenuti:

$$\begin{cases} \mu = 9.175 \\ \alpha_2 = \mu_2 - \mu = 5.1275 - 9.1750 = -4.0475 \\ \alpha_3 = \mu_3 - \mu = 16.86 - 9.1750 = 7.685 \\ \alpha_4 = \mu_4 - \mu = 26.7725 - 9.1750 = 17.5975 \end{cases}$$

Tabella 7.1: Tabella dei dati osservati, dei valori attesi, dei residui e dei loro quadrati

Erbicida	Weight	Attesi	Residui	Residui <sup>2</sup>
Unweeded	24.62	26.773	-2.153	4.633
Unweeded	30.94	26.773	4.167	17.368
Unweeded	24.02	26.772	-2.752	7.576
Unweeded	27.51	26.772	0.738	0.544
Metribuzin_348	15.20	9.175	6.025	36.301
Metribuzin_348	4.38	9.175	-4.795	22.992
Metribuzin_348	10.32	9.175	1.145	1.311
Metribuzin_348	6.80	9.175	-2.375	5.641
Mixture_378	6.14	5.127	1.013	1.025
Mixture_378	1.95	5.127	-3.177	10.097
Mixture_378	7.27	5.127	2.143	4.590
Mixture_378	5.15	5.127	0.023	0.001
Rimsulfuron_30	10.50	16.860	-6.360	40.450
Rimsulfuron_30	20.70	16.860	3.840	14.746
Rimsulfuron_30	20.74	16.860	3.880	15.054
Rimsulfuron_30	15.50	16.860	-1.360	1.850

### 7.6.2 Residui

Abbiamo già visto che i valori attesi ( $\bar{Y}_i$ ) sono pari, per ogni osservazione, alla somma tra  $\mu$  e il valor  $\alpha$  relativo al gruppo di cui l'osservazione fa parte. In questo caso, il valore atteso coincide con la media di ogni gruppo e, pertanto, i residui ( $\varepsilon_i = Y - \bar{Y}_i$ ) possono essere calcolati facilmente, come indicato in Tabella 7.1.

### 7.6.3 Stima di $\sigma$

Abbiamo detto che  $\sigma$  è la deviazione standard dei residui, che tuttavia deve essere calcolata facendo attenzione al numero dei gradi di libertà. Partiamo dalla devianza dei residui, che possiamo ottenere come somma dei quadrati riportati nell'ultima colonna a destra in Tabella 7.1. Otteniamo il valore RSS = 184.17745.

I residui costituiscono lo scostamento di ogni dato rispetto alla media del trattamento e, di conseguenza, per ogni gruppo la loro somma deve essere 0. Quindi per ogni gruppo vi sono 3 gradi di libertà, cioè 12 gradi di libertà in totale ( $3 \times 4$ , cioè il numero dei trattamenti per il numero delle repliche meno una). Ne consegue che la varianza dei residui è pari a:

$$MS_e = \frac{184.178}{12} = 15.348$$

La deviazione standard  $\sigma$  è:

$$\sqrt{15.348} = 3.9177$$

#### 7.6.4 SEM e SED

Abbiamo visto che la varianza d'errore è pari a 15.348 e pertiene ad ogni singola osservazione effettuata durante l'esperimento. Questa osservazione ci può aiutare a costruire una banda di inferenza attorno alle medie stimate; infatti, noi abbiamo osservato  $m_1, m_2, m_3$  ed  $m_4$  e con la nostra stima puntuale, abbiamo assunto che i valori osservati coincidessero rispettivamente con  $\mu_1, \mu_2, \mu_3$  e  $\mu_4$ . Analogamente a quanto abbiamo visto in un capitolo precedente, possiamo calcolare l'incertezza associata alle nostre stime attraverso l'Errore Standard di una Media (SEM), pari a:

$$SEM = \sqrt{\frac{MS_e}{n}} = \frac{3.9177}{\sqrt{4}}$$

Oltre che di una media, spesso siamo interessati anche a conoscere la varianza della differenza di due medie. Dato che la differenza di variabili casuali ha una varianza pari alla somma delle varianze delle due variabili originali, possiamo scrivere che:

$$SED = \sqrt{MS_{media1} + MS_{media2}} = \sqrt{2 \cdot \frac{MS_e}{n}} = \sqrt{2} \cdot \frac{3.9177}{\sqrt{4}} = \sqrt{2} \cdot SEM$$

## 7.7 Scomposizione della varianza

La scomposizione della varianza, il cui significato sarà più chiaro in seguito, è la vera e propria ANOVA fisheriana. Può essere eseguita seguendo un metodo *sequenziale*, che è molto semplice e perfettamente valido quando i dati sono bilanciati, come in questo caso.

Il primo elemento da stimare è la devianza totale dei dati, cioè la somma dei quadrati degli scarti di ogni dato rispetto alla media generale:

$$SS = (24.62 - 14.48375)^2 + (30.94 - 14.48375)^2 + \dots \\ \dots + (15.50 - 14.48375)^2 = 1273.706$$

Questa devianza esprime la variabilità totale tra un dato e l'altro, sia quella dovuta al trattamento, sia quella puramente stocastica.

Abbiamo già calcolato la devianza dei residui ( $RSS = 184.17745$ ), che quantifica la variabilità dei dati dovuta ad effetti puramente casuali, ma non al trattamento sperimentale. Infatti, la variabilità di un dato rispetto alla media del gruppo a cui appartiene non può essere dovuta al trattamento, in quanto i soggetti dello stesso gruppo sono trattati allo stesso modo.

A questo punto ci chiediamo: qual è la devianza prodotta dal trattamento sperimentale? La devianza totale rappresenta la variabilità totale dei dati (trattamento + effetti stocastici), la devianza residua rappresenta la sola variabilità stocastica, di conseguenza, la differenza di queste due quantità rappresenta la devianza dovuta al trattamento sperimentale:

$$SS_t = SS - RSS = 1273.706 + 184.1774 = 1089.529$$

In realtà, oltretutto per differenza, la devianza del trattamento potrebbe anche essere ottenuta direttamente. Dobbiamo tener conto che la media generale delle osservazioni è pari a 14.48375; se le medie dei gruppi differiscono dalla media generale, ciò potrebbe essere dovuto all'effetto del trattamento, che è diverso in ogni gruppo. Quindi, la devianza del trattamento può essere calcolata come il quadruplo (abbiamo quattro repliche) della devianza tra le medie dei trattamenti:

$$SS_t = 4 \times [(9.1750 - 14.48375)^2 + (5.1275 - 14.48375)^2 + \\ + (16.86 - 14.48375)^2 + (26.7725 - 14.48375)^2] = 1089.529$$

A questo punto, ricordiamo che il nostro obiettivo è stabilire se il trattamento ha avuto un effetto significativo, cioè se l'effetto da esso prodotto si distingue dal 'rumore di fondo', ossia dall'elemento casuale rappresentato dal residuo. Tuttavia, le devianza del trattamento e del residuo non possono essere confrontate direttamente, in quanto hanno un numero diverso di gradi di libertà.

In particolare, la devianza del trattamento ha tre gradi di libertà (tre scarti liberi; in genere numero dei trattamenti - 1) e quindi la relativa varianza è:

$$MS_t = \frac{1089.529}{3} = 363.1762$$

La varianza del residuo è invece pari a 15.348 e, come abbiamo visto più sopra, ha 12 gradi di libertà. Le due varianze così ottenute possono essere confrontate, all'interno di una procedura di test d'ipotesi, che vedremo di seguito.

Prima, però, vale la pena di sottolineare come la procedura precedente ci abbia permesso di suddividere la variabilità totale delle osservazioni in due componenti, una dovuta al trattamento e una dovuta all'errore sperimentale. Per questo motivo, parliamo di scomposizione della varianza (variance partitioning) o analisi della varianza (ANalysis Of VAriance = ANOVA), che è lo strumento più utilizzato nella sperimentazione biologica e che dobbiamo totalmente all'inventiva di Ronald Fisher.

## 7.8 Test d'ipotesi

Abbiamo descritto il nostro esperimento e ne abbiamo individuato le caratteristiche rilevanti, stimando i parametri che meglio le descrivono (effetti dei trattamenti e varianza). Come già detto, dobbiamo chiederci se i dati rispettano le assunzioni di base del modello, ma di questo parleremo in una lezione a parte.

Ora, il nostro scopo è capire se il trattamento sperimentale abbia prodotto un effetto rilevante, maggiore di quello prodotto da altri elementi puramente casuali ('rumore di fondo').

L'ipotesi nulla è che il trattamento non abbia avuto effetto, cioè che:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

In altri termini, se l'ipotesi nulla è vera, i quattro campioni sono estratti da quattro popolazioni identiche, o meglio, dalla stessa popolazione. Ciò può essere anche declinato come:

$$H_0 : \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = 0$$

Una statistica rilevante per testare questa ipotesi è data dal rapporto tra la varianza del trattamento e quella dell'errore:

$$F = \frac{MS_t}{MS_e} = \frac{363.18}{15.348} = 23.663$$

E' evidente che se il trattamento non fosse stato efficace, non dovrebbe aver prodotto una variabilità di molto superiore a quella dell'errore (quindi  $F = 1$ ). In questo caso la variabilità prodotta dal trattamento è stata oltre 23 volte superiore a quella dell'errore. Delle due l'una: o il trattamento è stato efficace oppure io sono stato particolarmente sfortunato e, nell'organizzare questo esperimento, si è verificato un caso particolarmente raro.

Ci chiediamo: “se l'ipotesi nulla è vera, qual è la probabilità di osservare un valore di  $F$  così alto o più alto?”. In altre parole, “qual è la *sampling distribution* per  $F$ ?”. Potremmo costruire questa distribuzione empiricamente, attraverso una simulazione Monte Carlo.

Se assumiamo che l'ipotesi nulla è vera, allora i dati dovrebbero essere campionati da una distribuzione gaussiana con media pari a 14.48375 e deviazione standard pari a 3.9177 (vedi sopra). Possiamo quindi utilizzare un generatore di numeri casuali gaussiani, per ottenere un dataset, per il quale l'ipotesi nulla è certamente vera e sottoporlo alla scomposizione della varianza, per calcolare un valore di  $F$ .

Se ripetiamo questo processo, ad esempio, 100'000 volte, otteniamo 100'000 dataset, nei quali non vi è effetto del trattamento e altrettanti valori  $F$  in situazioni nelle quali l'ipotesi nulla è vera. Otteniamo quindi una *sampling distribution* empirica per  $F$  e possiamo valutare quanti valori sono superiori a 23.66.

Per chi voglia eseguire questa simulazione, il codice da utilizzare è riportato nell'appendice finale di questo capitolo. Diciamo solo che il valore minimo

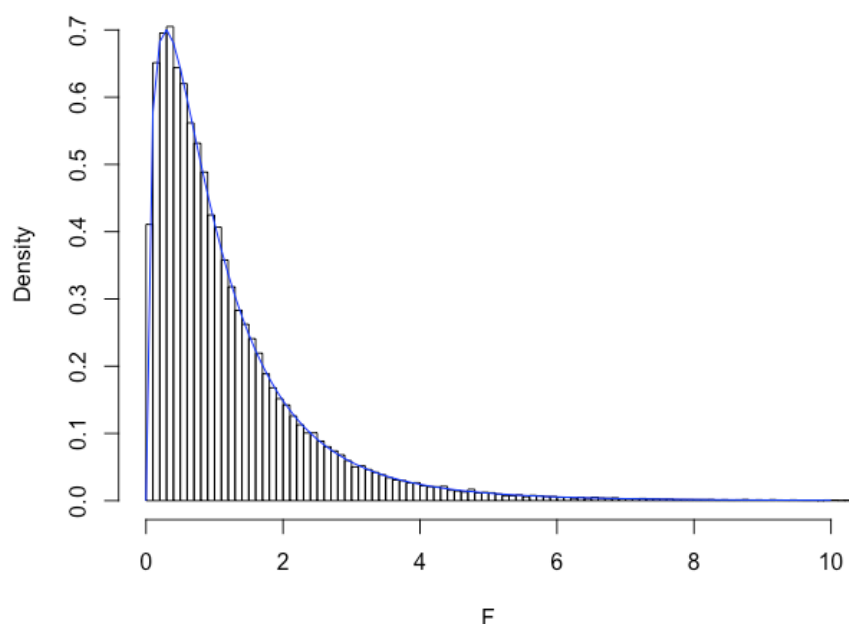


Figura 7.1: Sampling distribution empirica per  $F$ , con l'ipotesi nulla vera, per l'esempio

di  $F$  è stato 0.00019, il massimo 32.87, la media è stata 1.19 e la mediana 0.84. Tra tutti i 100'000 valori, ne abbiamo trovati solo due pari o superiori a quello osservato, il che vuol dire che la probabilità che l'ipotesi nulla sia vera con  $F = 23.66$  è pari a  $2 \times 10^{-5}$ .

La sampling distribution (opportunamente discretizzata) è riportata in figura 7.1. Si tratta di una distribuzione chiaramente non normale, ma assimilabile alla distribuzione  $F$  di Fisher (in realtà l'invenzione è di Snedecor, allievo di Fisher), con 3 gradi di libertà al numeratore e 12 al denominatore (in blue in figura).

Di conseguenza, possiamo evitare la simulazione Monte Carlo ed utilizzare la  $F$  di Fisher per calcolare la probabilità di ottenere un valore di  $F$  altrettanto estremo o più estremo del nostro. Ad esempio, in R, possiamo utilizzare la funzione:

```
pf(23.663, 3, 12, lower.tail = F)
## [1] 2.508789e-05
```

che porta ad un risultato molto simile a quello ottenuto con la simulazione di Monte Carlo. Insomma, in assenza di un effetto del trattamento (quindi per il solo effetto del caso), se ripetiamo l'esperimento infinite volte, abbiamo



una probabilità molto bassa che si produca un valore di  $F$  altrettanto alto o più alto di quello da noi osservato.

Di conseguenza, se rifiutiamo l'ipotesi nulla di assenza di effetto del trattamento e accettiamo l'ipotesi alternativa (il trattamento ha avuto effetto significativo) ci portiamo dietro un rischio di errore estremamente piccolo, comunque molto al disotto della soglia prefissata del 5%.

## 7.9 Operazioni con R

La stima dei parametri di un modello lineare, in R, può essere eseguita in modo molto banale, utilizzando la funzione `lm()`. Il codice è il seguente:

```
mod <- lm(Weight ~ factor(Treat), data = dataset)
```

Il primo argomento rappresenta il modello lineare che vogliamo adattare ai dati: l'incisione dell'intercetta, codificata con il carattere '1' è opzionale ('Weight ~ 1 + Treat' e 'Weight ~ Treat' sono equivalenti), mentre il termine stocastico  $\epsilon$  viene incluso di default e non deve essere indicato. Il termine 'factor' sta a significare che la variabile 'Treat' è un fattore sperimentale; questa specifica è opzionale quando la variabile è di tipo 'carattere' (come in questo caso), ma è fondamentale quando abbiamo a che fare con una variabile a codifica numerica.

Una volta operato l'adattamento, l'oggetto 'mod' contiene tutti i risultati, che possiamo ottenere con opportuni 'estrattori'. Ad esempio, la funzione 'summary()' restituisce le stime dei parametri:

```
summary(mod)
##
## Call:
## lm(formula = Weight ~ factor(Treat), data = dataset)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -6.360 -2.469  0.380  2.567  6.025
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)         9.175      1.959   4.684 0.000529 ***
## factor(Treat)Mixture_378 -4.047      2.770  -1.461 0.169679
## factor(Treat)Rimsulfuron_30  7.685      2.770   2.774 0.016832 *
```

```
## factor(Treat)Unweeded      17.598      2.770      6.352 3.65e-05 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 3.918 on 12 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.8554, Adjusted R-squared:  0.8193
## F-statistic: 23.66 on 3 and 12 DF,  p-value: 2.509e-05
```

Notiamo immediatamente che viene utilizzata la parametrizzazione con vincolo sul trattamento, visto che l'intercetta coincide con la media del primo trattamento. I valori di  $\alpha$  non sono altro che differenze tra questa media e tutte le altre medie.

I valori attesi e i residui possono essere ottenuti, in R, applicando due metodi 'fitted()' e 'residuals()' all'oggetto ottenuto dal fitting:

```
attesi <- fitted(mod)
epsilon <- residuals(mod)
```

La devianza del residuo (somma dei quadrati degli scarti) è:

```
deviance(mod)
## [1] 184.1774
```

mentre la deviazione standard del residuo ( $\sigma$ ), già visualizzabile nell'output della funzione 'summary()', può essere estratta come:

```
summary(mod)$sigma
## [1] 3.917668
```

La tabella finale dell'ANOVA può essere ottenuta in R utilizzando la seguente funzione:

```
anova(mod)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Weight
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## factor(Treat)  3 1089.53   363.18   23.663 2.509e-05 ***
## Residuals     12  184.18    15.35
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

## 7.10 Medie marginali attese

Abbiamo visto che le somme  $\mu + \alpha_j$  restituiscono le medie dei trattamenti e prendono il nome di **medie marginali attese**. Quando l'esperimento è bilanciato (ugual numero di repliche per ogni trattamento), esse sono uguali alle medie aritmetiche di ogni gruppo, mentre, quando l'esperimento è sbilanciato esso sono diverse, ma costituiscono una stima migliore delle medie delle popolazioni da cui i gruppi sono estratti rispetto alle medie aritmetiche. In R, il metodo più semplice per calcolare le medie marginali attese è quello di utilizzare la funzione `'emmeans()'`, nel package `'emmeans'` (Lenth, 2016), che deve essere preventivamente installato e caricato in memoria.

```
#install.packages("emmeans") # Installare il package
library(emmeans) #Caricare il package in memoria
medie <- emmeans(mod, ~Treat)
medie
## Treat          emmean    SE df lower.CL upper.CL
## Metribuzin__348    9.18 1.96 12     4.91    13.4
## Mixture_378        5.13 1.96 12     0.86     9.4
## Rimsulfuron_30    16.86 1.96 12    12.59    21.1
## Unweeded          26.77 1.96 12    22.50    31.0
##
## Confidence level used: 0.95
```

## 7.11 Per concludere ...

1. Con l'ANOVA la variabilità totale dei dati viene decomposta in due quote, una attribuibile al trattamento sperimentale ed una inspiegabile (residuo)
2. L'effetto del trattamento è significativo, se la variabilità che esso provoca è superiore a quella inspiegabile
3. Il confronto tra varianze viene impostato sotto forma di rapporto (F).
4. L'ipotesi nulla è che il trattamento NON HA AVUTO effetto significativo
5. Sotto questa ipotesi nulla, l'F osservato ha una distribuzione F di Fisher
6. L'ipotesi nulla è rifiutata quando  $P \leq 0.05$  (livello di protezione arbitrario, ma universalmente accettato)

Ovviamente, è necessario ricordare che tutte le considerazioni fatte finora sono valide se il dataset è conforme alle assunzioni di base per l'ANOVA,

per cui bisogna sempre eseguire i necessari controlli, di cui parleremo nel prossimo capitolo.

---

## 7.12 Per approfondire un po'...

### 7.12.1 Simulazione della *sampling distribution* per F

Di seguito forniamo il codice per simulare la *sampling distribution* per F, quando l'ipotesi nulla è vera. Il codice impiega un generatore di numeri casuali gaussiano per ottenere dataset nei quali l'ipotesi nulla è vera, perché non vi è effetto del trattamento.

```
Fvals <- c()
set.seed(1234)
for(i in 1:100000){
  Ysim <- rnorm(16, 14.48375, 3.9177)
  Fvals[i] <- anova ( lm(Ysim ~ factor(Treat), data = dataset))$F[1]
}
min(Fvals)
max(Fvals)
length(Fvals[Fvals > 23.663])
```

I risultati ottenuti sono quelli esposti più sopra

### 7.12.2 Altre letture

1. Faraway, J.J., 2002. Practical regression and Anova using R. <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Faraway-PRA.pdf>, R.
2. Fisher, Ronald (1918). "Studies in Crop Variation. I. An examination of the yield of dressed grain from Broadbalk" (PDF). *Journal of Agricultural Science*. 11 (2): 107–135.
3. Kuehl, R. O., 2000. Design of experiments: statistical principles of research design and analysis. Duxbury Press (CHAPTER 2)
4. Lenth, R.V., 2016. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *Journal of Statistical Software* 69. <https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01>

## Capitolo 8

# La verifica delle assunzioni di base

Nel momento in cui eseguiamo test d'ipotesi nell'ambito di un modello lineare, assumiamo implicitamente che i dati rispondano ai seguenti requisiti:

1. il modello è corretto;
2. la risposta osservata è una funzione del modello più o meno l'errore sperimentale;
3. l'errore sperimentale è indipendente dal modello;
4. gli errori sono normalmente distribuiti, con media zero e varianze omogenee;
5. gli errori rilevati in esperimenti ripetuti sono tra loro indipendenti.
6. non ci sono osservazioni aberranti;

Il rispetto di alcune di queste assunzioni di base è garantito dal disegno sperimentale, con il quale, attraverso la randomizzazione, si cerca di evitare ogni possibile confusione tra effetti deterministici ed errore sperimentale e si fa in modo che le osservazioni siano indipendenti tra di loro. Eventuali vincoli alla randomizzazione introdotti in fase di disegno (es. blocking) vengono gestiti con l'adozione di un modello ANOVA che ne riconosca l'esistenza (vderemo, ad esempio, l'ANOVA a blocchi randomizzati).

Ci sono tuttavia alcune assunzioni di base che possono essere verificate solo *a posteriori*, cioè dopo aver effettuato la stima dei parametri. Queste assunzioni riguardano la struttura dei residui, che debbono essere normalmente distribuiti, omoscedastici e non debbono contenere valori aberranti. Ovviamente, per ottenere i residui, devo prima procedere al fitting del mo-

dello, individuare i valori attesi e quantificare il loro scostamento rispetto alle osservazioni.

Il rispetto delle assunzioni di base è importante, perché ogni deviazione può inficiare la validità dei test d'ipotesi e delle inferenze in genere, modificando il livello di significatività.

## 8.1 Procedure diagnostiche

Per diagnosticare eventuali patologie dei dati, possiamo utilizzare diverse procedure, così classificate:

1. metodi grafici
2. metodi formali, tramite test d'ipotesi

## 8.2 Analisi grafica dei residui

La gran parte dei pre-requisiti fondamentali di un dataset riguardano la struttura dei residui e, di conseguenza, l'ispezione grafica di questi ultimi, eventualmente accompagnata da semplici strumenti algebrici, possono permetterci di evidenziare la gran parte delle 'patologie' di cui soffrono i dati sperimentali. Si può affermare che l'ispezione dei residui è uno strumento diagnostico fondamentale, il cui impiego dovrebbe rientrare tra le metodiche di routine per ogni elaborazione statistica dei dati.

Ricordo che i residui sono gli scostamenti tra i valori osservati e quelli attesi sulla base del modello in studio; hanno sempre media 0, mentre la deviazione standard cambia di volta in volta.

### 8.2.1 Grafico dei residui contro i valori attesi

Il metodo grafico più utilizzato per l'analisi dei residui consiste nel plottare i residui verso i valori attesi. Se non vi sono problemi, i punti nel grafico dovrebbero essere distribuiti in modo assolutamente casuale, come in figura 8.1.

Le osservazioni aberranti (*outliers*) sono chiaramente indicate nel grafico dei residui come punti isolati rispetto agli altri (Figura 8.2).

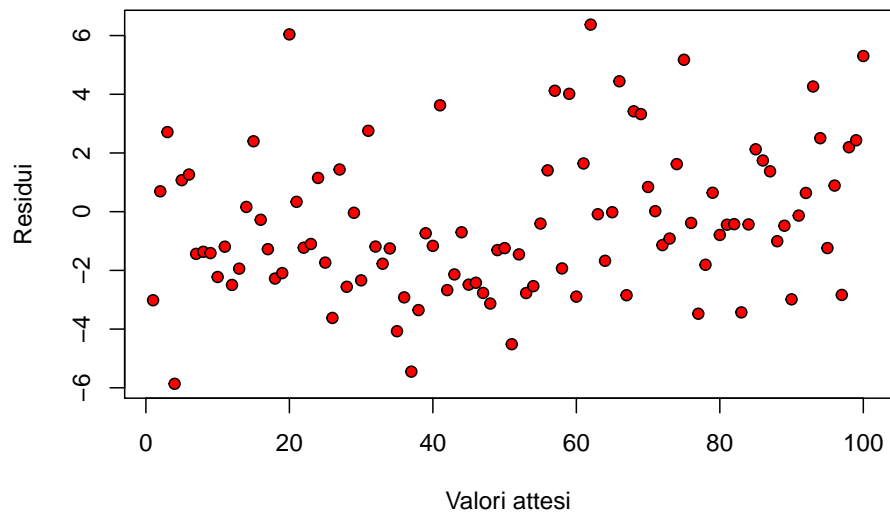


Figura 8.1: Grafico dei residui verso gli attesi: non è visibile nessuna deviazione rispetto agli assunti di base dei modelli lineari

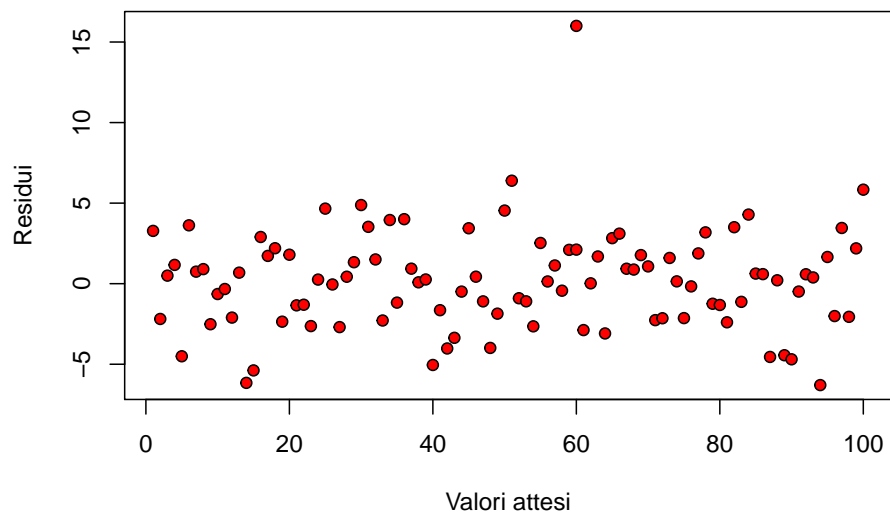


Figura 8.2: Grafico dei residui verso gli attesi: presenza di un dato aberrante

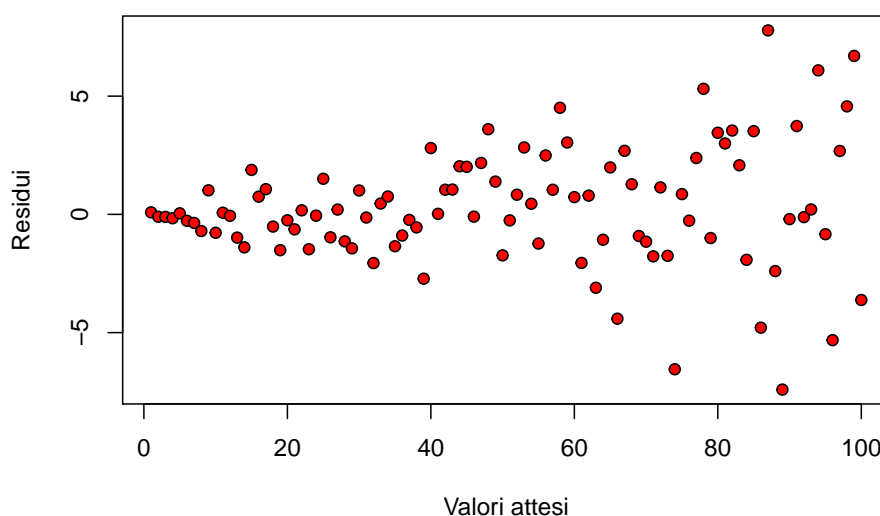


Figura 8.3: Grafico dei residui verso gli attesi: esempio di eteroscedasticità

L'eterogeneità delle varianze è invece indicata da residui che si allargano o si stringono procedendo verso i margini del grafico (Figura 8.3), facendo emergere una sorta di proporzionalità tra media e varianza.

A volte la relazione causa effetto non è lineare o, comunque, il modello devia sistematicamente dai dati osservati. Di conseguenza, i residui mostrano un evidente pattern legato al segno. Ad esempio, nella figura 8.4 i residui sono tendenzialmente negativi per bassi valori attesi e positivi per alti valori.

### 8.2.2 QQ-plot

Il grafico dei residui verso i valori attesi non è in grado di evidenziare problemi di non-normalità. A questo fine, risulta molto utile un QQ-plot (quantile-quantile plot), nel quale i residui *standardizzati* vengono plottati contro i rispettivi percentili di una distribuzione normale standardizzata. Se la distribuzione dei dati è effettivamente normale, le due grandezze (i percentili nel campione e i percentili di una distribuzione normale standardizzata) dovrebbero essere largamente coincidenti; ad esempio, se la distribuzione è normale i residui negativi dovrebbero essere più o meno ugualmente numerosi di quelli positivi e non ci dovrebbero essere residui troppo alti in valore assoluto, soprattutto se il dataset è piccolo (infatti i valori estremi sono rari e dovrebbero comparire di rado). Se questo è vero, il QQ-plot dovrebbe essere costituito da punti che giacciono lungo la bisettrice del primo e del terzo quadrante (8.5)



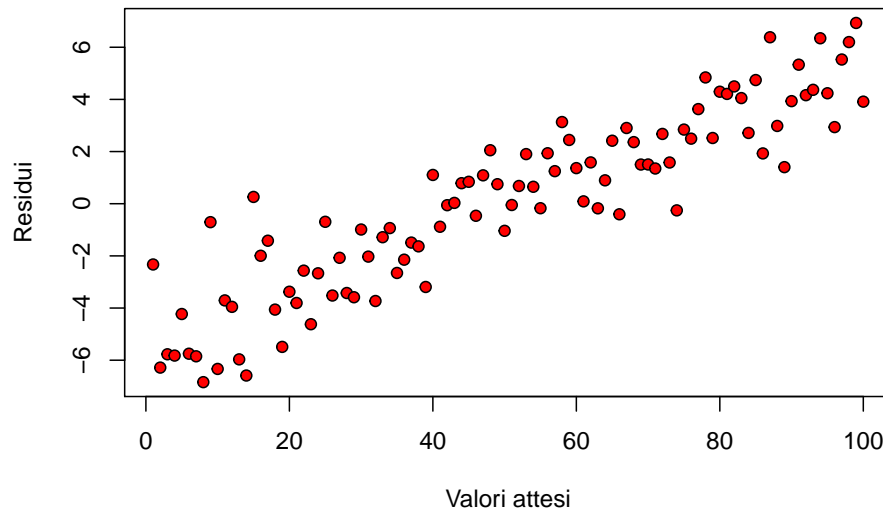


Figura 8.4: Grafico dei residui verso gli attesi: esempio di lack of fit (nonlinearità)

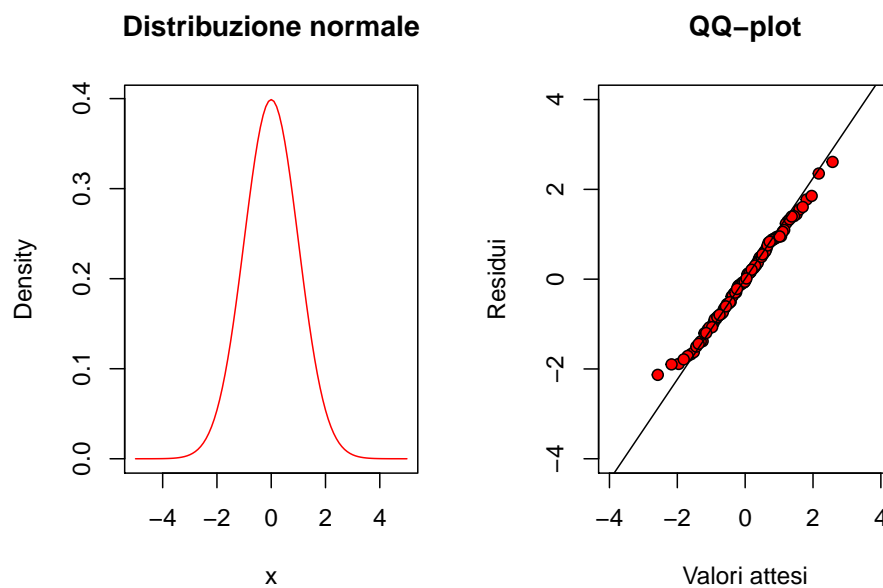


Figura 8.5: QQ-plot per un dataset normalmente distribuito

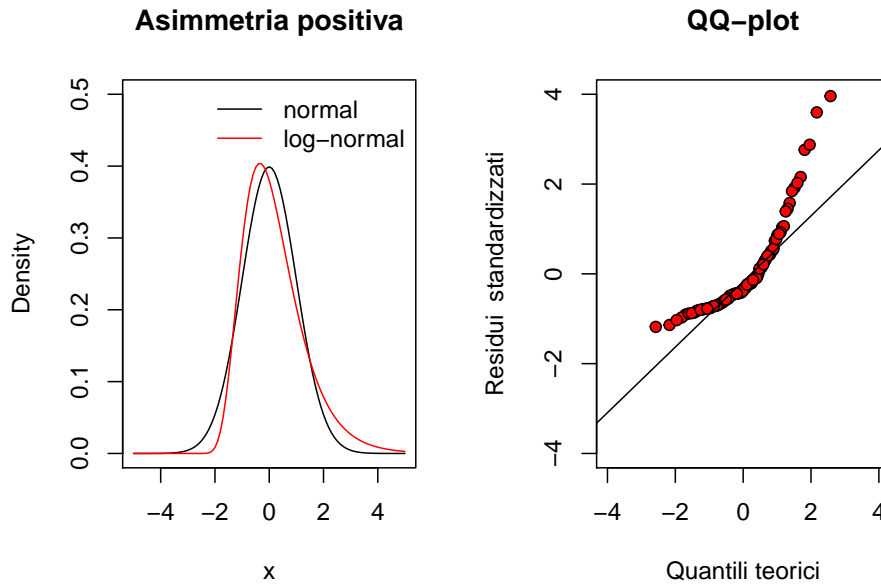


Figura 8.6: QQ-plot per un dataset con asimmetria positiva (right-skewed)

Le deviazioni più diffuse dalla normalità sono relative alla simmetria (skewness) e alla curtosi della popolazione. In particolare, può capitare che i residui abbiano asimmetria positiva (right-skewed: la media è maggiore della mediana), così che quelli negativi sono più numerosi di quelli positivi, ma questi ultimi sono mediamente di più elevato valore assoluto. Ad esempio, una distribuzione log-normale centrata è right-skewed ed, estraendo da questa una serie di valori, il QQ-plot si presenta come in figura 8.6.

Al contrario, in una distribuzione left-skewed (asimmetria negativa), la media è minore della mediana e, di conseguenza, i residui positivi sono più numerosi, ma di valore assoluto più basso che non nella distribuzione normale corrispondente. Ad esempio, una distribuzione beta, in certe condizioni (traslazione, alto  $a$  e basso  $b$ ), è left-skewed e i valori campionati presentano un QQ-plot con un andamento tipico (8.7):

Per quanto riguarda la curtosi, è necessario osservare le code della distribuzione: se queste sono più alte di una distribuzione normale parliamo di distribuzione platicurtica, mentre se sono più basse parliamo di distribuzione leptocurtica. Ad esempio, una distribuzione di  $t$  di Student con pochi gradi di libertà è platicurtica ed il QQ-plot mostra l'andamento indicato in figura 8.8.

Al contrario, una distribuzione uniforme in un intervallo ristretto è tipicamente leptocurtica e presenta un QQ-plot come quello riportato in Figura

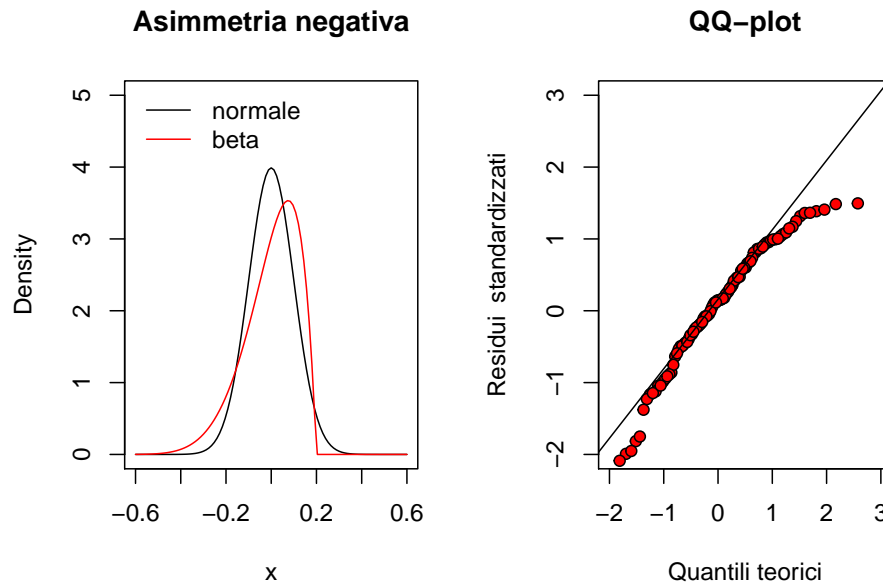


Figura 8.7: QQ-plot per un dataset con asimmetria negativa (left-skewed)

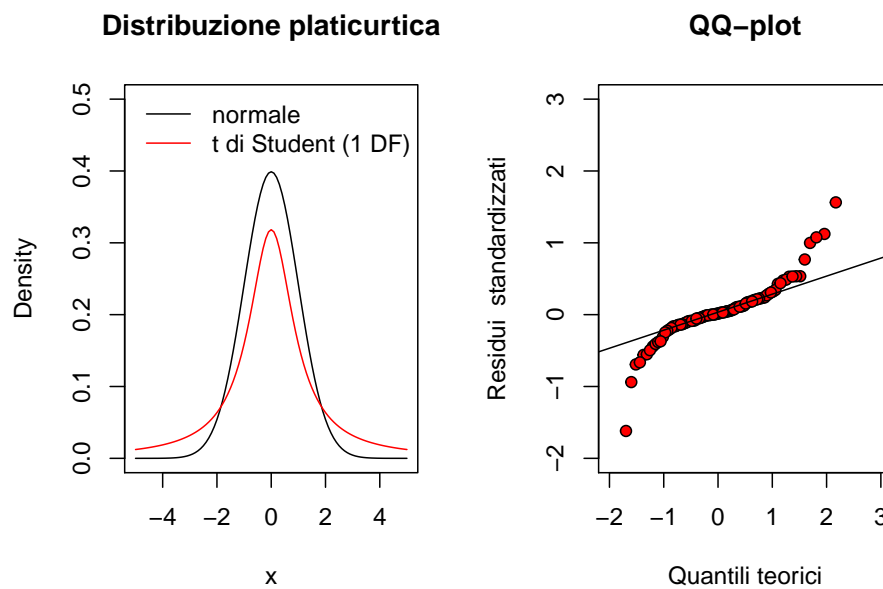


Figura 8.8: QQ-plot per un dataset con distribuzione platicurtica

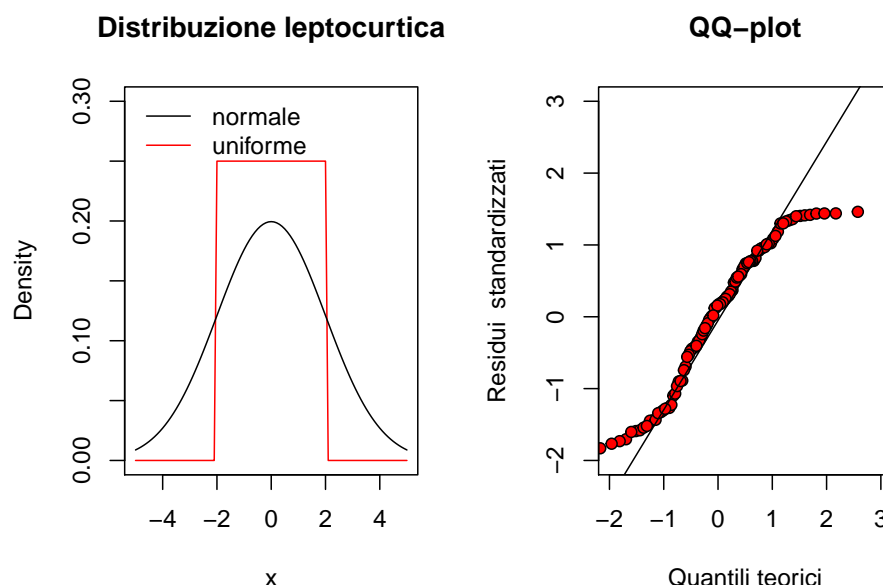


Figura 8.9: QQ-plot per un dataset con distribuzione leptocurtica

8.9.

### 8.3 Strumenti diagnostici formali

Le valutazioni precedentemente esposte sono di tipo grafico e sono considerate sufficientemente robuste per la maggior parte delle situazioni. Tuttavia, esistono anche test statistici che consentono di saggiare l'ipotesi nulla di 'assenza di deviazioni'. Con questi test, basta guardare il 'p-value': se questo è inferiore a 0.05 l'ipotesi nulla deve essere rifiutata e può essere necessario intraprendere azioni correttive.

Per l'omogeneità delle varianze veniva utilizzato il test di Bartlett, che, tuttavia, è oggi caduto in disuso, data la sua sensibilità alla non-normalità dei residui, quasi sempre presente, insieme all'eteroscedasticità. Oggi si preferisce utilizzare il test di Levene, che consiste nel sottoporre ad ANOVA i residui in valore assoluto, al posto dei dati osservati. Per ogni trattamento, i residui hanno media zero, ma se vengono presi in valore assoluto, hanno medie più alte quando la loro varianza è alta. Per esempio, possiamo prendere due campioni centrati, con media zero a varianza rispettivamente pari a 1 e 4:

```

A <- c(-1, 0, 1); B <- c(-4, 0, 4)
mean(A); mean(B)
## [1] 0
## [1] 0
var(A); var(B)
## [1] 1
## [1] 16

```

Se prendiamo i valori assoluti, la media del primo campione è  $2/3$ , mentre la media del secondo campione è  $8/3$ . Se questa differenza è significativa, essa produce il rifiuto dell'ipotesi nulla nel test F di ANOVA e conferma l'eterogeneità delle varianze. Il test di Levene, in R, si può eseguire con la funzione `'leveneTest()'` nel package `'car'`.

```

res <- c(A, B)
tratt <- rep(c("A", "B"), each = 3)
model <- lm(res ~ factor(tratt))
anova(model)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: res
##              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## factor(tratt)  1      0      0.0      0      1
## Residuals      4     34      8.5
car::leveneTest(res ~ factor(tratt), center=mean)
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 1  2.1176 0.2193
##      4

```

Il test di Levene può anche essere effettuato considerando gli scarti rispetto alla mediana (invece che alla media), in modo da ottenere un test più robusto nei confronti degli outliers.

Per quanto riguarda le deviazioni dalla normalità, può essere utilizzato il test di Shapiro-Wilks. Per esempio, nel caso di un dataset ottenuto da una distribuzione uniforme (quindi non-normale), il test di Shapiro porta ai risultati sotto indicati.

```

shapiro.test(runif(100, min = -2, max = 2))
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  runif(100, min = -2, max = 2)
## W = 0.94547, p-value = 0.0004227

```

## 8.4 Risultati contraddittori

La valutazione degli assunti di base è un passo fondamentale nell'analisi dei dati sperimentali e non deve mai essere dimenticata. Tuttavia, l'esperienza insegna che, nella pratica, è molto facile incontrare situazioni dubbie, nelle quali i risultati ottenuti con le diverse tecniche diagnostiche appaiono contraddittori e difficili da interpretare. Come comportarsi in questi casi? A mio parere bisogna sempre ricordare che la 'verità vera' ci sfugge e, di conseguenza, tutte le valutazioni debbono essere sempre condotte con il massimo 'buon senso'.

Un aspetto importante da considerare è la tipologia del dato: conteggi e proporzioni difficilmente sono normalmente distribuiti ed omoscedastici e, con questi dati, la prudenza non è mai troppa, quando si tratta di impiegare modelli lineari. Allo stesso modo, è necessaria una grande prudenza quando si analizzano variabili quantitative dove la differenza tra le diverse tesi è molto grande, orientativamente più di un ordine di grandezza. Con questi dati, l'assunzione di omogeneità delle varianze è quasi sempre violata.

## 8.5 'Terapia'

Se le procedure diagnostiche hanno evidenziato deviazioni rispetto agli assunti di base, è necessario valutare se e come intraprendere azioni correttive. Ovviamente, la 'terapia' cambia al cambiare della 'patologia'.

### 8.5.1 Correzione/Rimozione degli outliers

In presenza di outliers, la 'terapia' più opportuna è, banalmente, quella di rimuoverli, ottenendo così un dataset 'sbilanciato' (diverso numero di repliche per trattamento). Oggigiorno, trattare un dataset sbilanciato non costituisce un problema, ovviamente se si utilizzano le metodiche di analisi opportune. Qualche anno fa, al contrario, si cercava di evitare lo sbilanciamento a tutti i costi, utilizzando tecniche di imputing per l'immissione di valori 'ragionevoli' in sostituzione di quelli mancanti/aberranti. Con le dovute eccezioni, le tecniche di imputing sembrano oggi abbastanza obsolete.

Vorrei porre l'attenzione sul fatto che i dati aberranti sono dati molto 'influenziali', nel senso che possono influenzare in modo molto marcato il risultato dell'analisi. Pertanto, se è sbagliato correggerli arbitrariamente, senza

aver prima accertato che siano effettivamente frutto di errore, è altrettanto sbagliato lasciarli nel dataset. Ovviamente, la correzione non può che riguardare una larga minoranza dei dati sperimentali raccolti (uno o due dati), altrimenti si dovrà necessariamente pensare di ripetere l'esperimento.

### 8.5.2 Correzione del modello

Abbiamo visto che il modello impiegato potrebbe non essere adatto a descrivere il dataset (mancanza di adattamento). Gli effetti potrebbero non essere addittivi, ma moltiplicativi, oppure potrebbero essere non-lineari. Potrebbero essere presenti asintoti che il nostro modello non è in grado di descrivere, oppure la crescita/decrecita osservata potrebbero essere più lente/veloci di quanto la nostra funzione sia in grado di modellizzare. Per tutti questi casi, ovviamente, la strategia più consigliabile è quella di utilizzare un diverso modello, capace di descrivere meglio le osservazioni sperimentali.

### 8.5.3 Trasformazione della variabile indipendente

A volte la variabile dipendente non è qualitativa, bensì quantitativa. Vedremo meglio questo aspetto nei prossimi capitoli, quando parleremo di regressione. Tuttavia, anticipiamo che, quando la variabile indipendente è quantitativa, essa può essere sottoposta ad opportuna trasformazione. Ad esempio, se i dati mostrano un andamento esponenziale, la trasformazione della variabile indipendente in logaritmo può portare al sensibile miglioramento del fitting con un'equazione lineare.

### 8.5.4 Impiego di metodiche statistiche avanzate

In presenza di deviazioni sistematiche rispetto agli assunti di base, la cosa più logica sarebbe quella di chiedersi perché il dataset è non-normale e/o eteroscedastico ed incorporare queste informazioni nel modello. Ad esempio, un conteggio potrebbe seguire la distribuzione di Poisson, oppure una serie di proporzioni potrebbero seguire la distribuzione binomiale. In questi casi sarebbe opportuno utilizzare modelli lineari generalizzati (GLiM), basati non sulla distribuzione normale, ma su altre distribuzioni, più adatte per il fenomeno in studio. Allo stesso modo, l'eterogeneità delle varianze può essere incorporata nel modello, utilizzando tecniche dei minimi quadrati generalizzati (GLS). In altri casi, quando non si riescono a rispettare le assunzioni

di base dei modelli, si può ricorrere a metodiche statistiche che ne fanno di meno e che, pertanto, sono dette metodiche ‘non-parametriche’.

In questo libro, non tratteremo né GLiM, né i GLs, né le metodiche non parametriche. Per quello che riguarda GLiM e GLS, si tratta di metodiche che richiedono un corso di livello più avanzato; per quanto riguarda le metodiche non-parametriche, di esse non parleremo, per una questione di preferenze personali: a mio modo di vedere, utilizzare metodiche non-parametriche è come rinunciare in partenza a comprendere le basi biologiche del fenomeno e le intrinseche relazioni causa-effetto che sussistono nella realtà.

### 8.5.5 Trasformazioni stabilizzanti

Una strategia empirica, ma molto seguita in pratica e caratterizzata da un’efficacia non disprezzabile, è quella di ricorrere alle trasformazioni correttive. Con questa tecnica, si va a cercare una metrica sulla quale le assunzioni di base dell’ANOVA siano rispettate e si esegue l’elaborazione dei dati trasformati invece che di quelli non trasformati.

Per i conteggi e per l’eterogeneità delle varianze di variabili continue, si consiglia la trasformazione in radice quadrata o in logaritmo, scegliendo in base a quella che consente la miglior distribuzione dei residui. Per le proporzioni, taluni consigliano la trasformazione nell’arcoseno della radice del valore, che è implementata nel package ‘aomisc’, nella funzione ‘angularTransform()’. Questa funzione riceve come input un valore percentuale e restituisce l’arcoseno della radice quadrata della proporzione corrispondente.

```
aomisc::angularTransform(c(26, 47, 25, 28, 24))
## [1] 30.65730 43.28009 30.00000 31.94806 29.33387
```

Per evitare di scegliere la trasformazione ‘al buio’, si può impiegare la procedura suggerita da Box e Cox (1964), basata su una ‘famiglia di trasformazioni’, definita come segue:

$$W = \begin{cases} \frac{Y^\lambda}{\lambda-1} & \text{if } \lambda \neq 0 \\ \log(Y) & \text{if } \lambda = 0 \end{cases}$$

dove  $W$  è la variabile trasformata,  $Y$  è la variabile originale e  $\lambda$  è il parametro che definisce la trasformazione. In particolare, osserviamo che se  $\lambda$  è pari ad 1 i dati non sono, di fatto, trasformati, se è pari a 0.5 abbiamo una trasformazione equivalente alla radice quadrata, se è pari a 0 abbiamo



la trasformazione logaritmica, se è pari a -1 abbiamo una trasformazione equivalente al reciproco.

La scelta del valore  $\lambda$  può essere effettuata in modo empirico, confrontando la verosimiglianza di modelli basati su trasformazioni diverse. In R, questa procedura è automatizzata nella funzione ‘boxcox()’, disponibile nel package MASS è verrà illustrata nell’esempio successivo.

## 8.6 Esempio

Proviamo ad analizzare il dataset ‘insects’, disponibile nel package ‘aomisc’. Si tratta di un dataset nel quale quindici piante sono state trattate con tre insetticidi diversi in modo completamente randomizzato, scegliendo cinque piante a caso per insetticida. Alcune settimane dopo il trattamento è stato rilevato il numero di insetti presenti su ciascuna pianta. Lasciando da parte le statistiche descrittive, eseguiamo subito l’ANOVA per questo dataset.

```
library(aomisc)
data(insects)
head(insects)
##      Insecticide Rep Count
## 1              A   1   448
## 2              A   2   906
## 3              A   3   484
## 4              A   4   477
## 5              A   5   634
## 6              B   1   211
mod <- lm(Count ~ Insecticide, data = insects)
```

Dopo aver effettuato l’ANOVA, i grafici dei residui possono essere ottenuti utilizzando la funzione ‘plot()’ applicata al risultato del fitting lineare. L’argomento ‘which’ specifica il tipo di grafico: se utilizziamo: ‘which = 1’ otteniamo il grafico dei residui verso gli attesi, se invece utilizziamo ‘which = 2’ otteniamo il QQ-plot. I due comandi sono:

```
plot(mod, which = 1)
plot(mod, which = 2)
```

e forniscono l’output riportato in figura 8.10.

Questo dataset mostra una chiara eteroscedasticità (vedi il grafico di sinistra) e qualche indizio di asimmetria positiva.

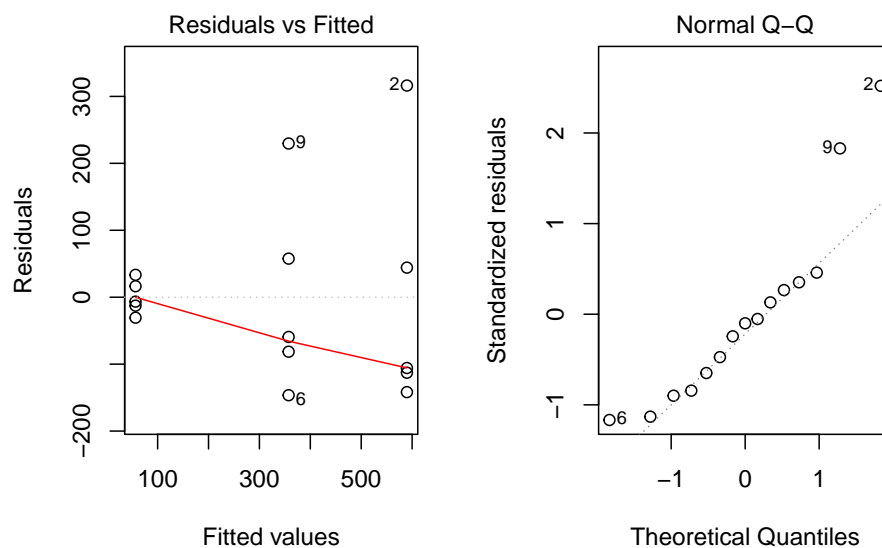


Figura 8.10: Analisi grafica dei residui per il dataset 'insects.csv'

```
car::leveneTest(mod)
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 2  1.0263 0.3878
##      12
shapiro.test(residuals(mod) )
##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuals(mod)
## W = 0.87689, p-value = 0.04265
```

I test di Levene e Shapiro-Wilks confermano che la mancanza di normalità è significativa e, pertanto, scegliamo di impiegare una trasformazione correttiva. Utilizziamo quindi la funzione 'boxcox()' per individuare la trasformazione più adatta a correggere la patologia riscontrata. Il comando è:

```
library(MASS)
boxcox(mod)
```

e fornisce l'output in figura 8.11.

Vediamo che la verosimiglianza del modello raggiunge il massimo valore quando  $\lambda$  è pari a 0.14. I limiti dell'intervallo di confidenza vanno da poco sotto lo 0 a 0.5 circa. Rimanendo nell'ambito dell'intervallo di confidenza, scegli-

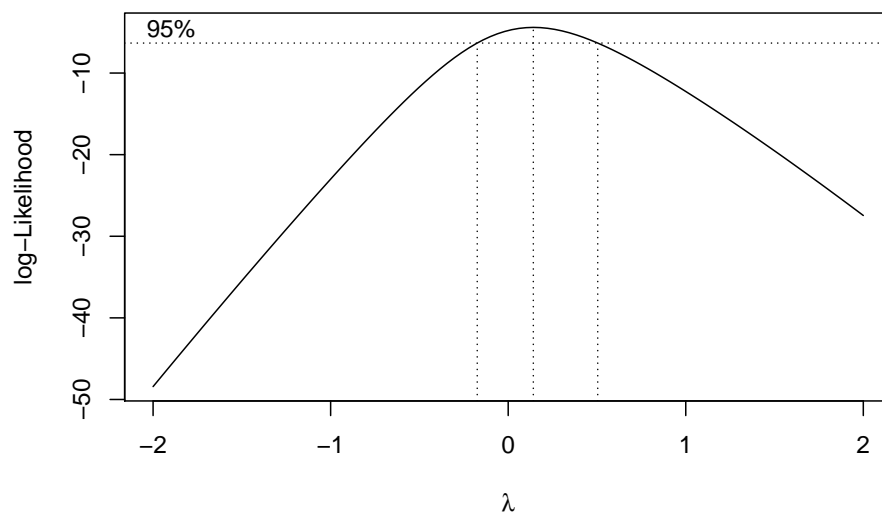


Figura 8.11: Scelta del valore ottimale di lambda per la trasformazione di Box e Cox

mo il valore  $\lambda = 0$ , che corrisponde alla trasformazione logaritmica. Questa scelta è motivata dal fatto che si tratta di una trasformazione molto nota e facilmente comprensibile.

Pertanto, trasformiamo i dati nel logaritmo e ripetiamo l'ANOVA.

```
mod <- lm(log(Count) ~ Insecticide, data = insects)
par(mfrow = c(1,2))
plot(mod, which = 1)
plot(mod, which = 2)
```

Vediamo che i dati trasformati non mostrano più alcun sintomo di eteroscedasticità e, di conseguenza, l'ANOVA su questa metrica è totalmente affidabile. Ovviamente, avendo lavorato con il logaritmo dei dati, commentare i risultati potrebbe essere più complicato, in quanto dovremmo calcolare le medie marginali attese su scala logaritmica, come indicato nel codice sottostante.

```
library(emmeans)
medie <- emmeans(mod, ~Insecticide)
medie
```

	Insecticide	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
##	A	6.34	0.178	12	5.96	6.73
##	B	5.81	0.178	12	5.43	6.20
##	C	3.95	0.178	12	3.56	4.34
##						

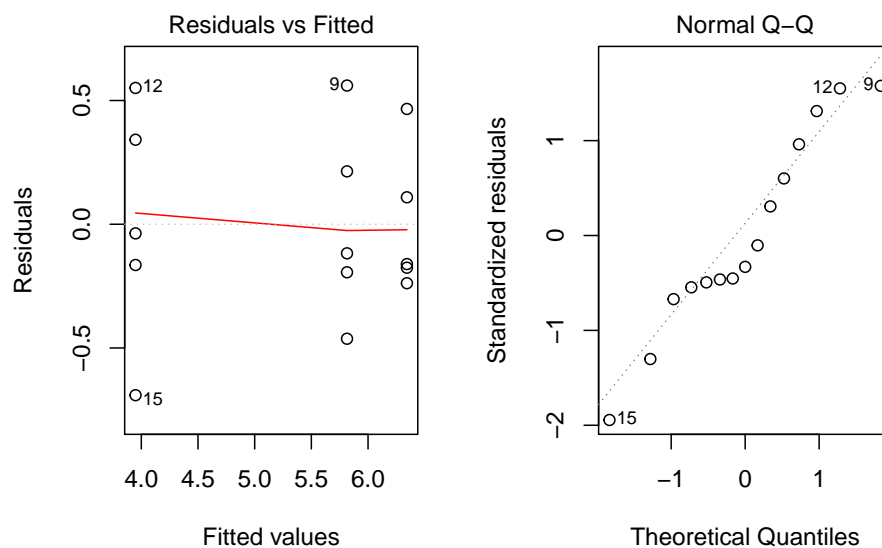


Figura 8.12: Analisi grafica dei residui per il dataset 'insects.csv', previa trasformazione logaritmica

```
## Results are given on the log (not the response) scale.
## Confidence level used: 0.95
```

È evidente che presentare le medie su scala logaritmica potrebbe non essere di immediata o facile lettura. Per questo, potremmo pensare di retrotrasformare le medie, utilizzando la trasformazione inversa di quella logaritmica, cioè l'antilogaritmo. Ad esempio, per la prima media:

$$e^{6.34} = 566.7963$$

In questo modo la nostra unità di misura ridiventa quella originale, anche se il valore ottenuto non coincide con la media dei dati originali; in effetti la trasformazione è non lineare e la media dei logaritmi non può coincidere con il logaritmo della media. Possiamo osservare che la media del trattamento A, sulla scala originale, è:

```
mean(insects[insects$Insecticide == "A", "Count"])
## [1] 589.8
```

e risulta più alta della media retrotrasformata. In realtà, se è vero che i logaritmi sono normalmente distribuiti, la media dei logaritmi (6.34) dovrebbe essere uguale alla mediana (ricordiamo che in una distribuzione normale media e mediana coincidono). La mediana è il valore centrale; dato che la retro-trasformazione è monotona, il valore centrale resta centrale, anche se

io retrotrasformo. Quindi la media retrotrasformata è uno stimatore della mediana della popolazione originale, non della sua media. Questo non è uno svantaggio: infatti il QQ-plot suggerisce un'asimmetria positiva (confronta la Figura 8.11 con la Figura 8.6) cosa che è confermata dal fatto che la mediana è minore della media. Se la distribuzione dei dati è asimmetrica, la mediana è un indicatore di tendenza centrale migliore della media, perché meno sensibile ai valori estremi, che sono più frequenti in caso di asimmetria.

Il problema è che, se vogliamo utilizzare la media retrotrasformata, dobbiamo trovare un valore di errore standard per questa stima, con il quale esprimere la sua incertezza. In realtà, anche l'errore standard può essere retrotrasformato, con una tecnica detta metodo 'delta', che costituisce un'estensione della legge di propagazione degli errori per le trasformazioni non-lineari. È inutile andare nel dettaglio; diciamo solo che la funzione 'emmeans()' rende semplicissima l'implementazione del metodo delta, con il comando seguente:

```
retroMedie <- emmeans(mod, ~Insecticide, transform = "response")
retroMedie
## Insecticide response      SE df lower.CL upper.CL
## A              568.6 101.01 12    348.5     789
## B              335.1  59.54 12    205.4     465
## C               51.9   9.22 12     31.8      72
##
## Confidence level used: 0.95
```

Con questo abbiamo tutto quello che ci serve: stime ed errori standard, che, ovviamente, sono diversi per le diverse medie retrotrasformate, coerentemente con la mancanza di omoscedasticità.

## 8.7 Per approfondire un po' ...

1. Ahrens, W. H., D. J. Cox, and G. Budwar. 1990, Use of the arcsin and square root transformation for subjectively determined percentage data. *Weed science* 452-458.
2. Anscombe, F. J. and J. W. Tukey. 1963, The examination and analysis of residuals. *Technometrics* 5: 141-160.
3. Box, G. E. P. and D. R. Cox. 1964, An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society, B-26*, 211-243, discussion 244-252.

4. D'Elia, A. 2001, Un metodo grafico per la trasformazione di Box-Cox: aspetti esplorativi ed inferenziali. *STATISTICA LXI*: 630-648.
5. Saskia, R. M. 1992, The Box-Cox transformation technique: a review. *Statistician* 41: 169-178.
6. Weisberg, S., 2005. *Applied linear regression*, 3rd ed. John Wiley & Sons Inc. (per il metodo 'delta')

## Capitolo 9

# Contrasti e confronti multipli

La scomposizione della varianza (ANOVA fisheriana) rappresenta frequentemente il primo passo nell'elaborazione statistica dei dati sperimentali. Essa consente di quantificare l'errore sperimentale e ci permette di sapere se l'effetto del trattamento (nel suo complesso) è risultato significativo. Tuttavia, con la sola ANOVA non siamo ancora capaci di definire una graduatoria di merito tra i diversi livelli del trattamento sperimentale. Dopo l'ANOVA, è quindi logico chiedersi (in ordine crescente di importanza):

1. Il generico trattamento A ha un effetto diverso dal trattamento B?
2. Il trattamento A è migliore/uguale/peggiore di B?
3. Quant'è la differenza tra A e B?

La prima domanda è abbastanza sciocca, in quanto due trattamenti non sono quasi mai esattamente uguali. Le altre due domande sono invece più rilevanti, specialmente la seconda, in quanto conoscere l'entità della differenza, oltre che la sua significatività, è fondamentale per comprendere anche la sua rilevanza biologica. Infatti una differenza potrebbe essere significativa, ma irrilevante da un punto di vista agronomico o, viceversa, essa potrebbe essere non significativa, ma estremamente rilevante, quindi meritevole di ulteriori approfondimenti scientifici. Per rispondere alle domande precedenti, in genere, utilizziamo i **contrasti lineari**, che introdurremo con un esempio.

## 9.1 Esempio

Ammettiamo di aver effettuato una prova con un trattamento sperimentali caratterizzato da quattro livelli qualitativi (tesi di concimazione), con i risultati riportati di seguito:

```
yield <- c(20,21,23,22,19,20,12,15,13,19,18,16)
fert <- factor(rep(c("Minerale", "Minerale lento",
                    "Non concimato", "Organico"), each=3))
dataset <- data.frame(yield, fert)
rm(yield, fert)
dataset
##      yield      fert
## 1      20    Minerale
## 2      21    Minerale
## 3      23    Minerale
## 4      22 Minerale lento
## 5      19 Minerale lento
## 6      20 Minerale lento
## 7      12  Non concimato
## 8      15  Non concimato
## 9      13  Non concimato
## 10     19      Organico
## 11     18      Organico
## 12     16      Organico
```

L'ANOVA può essere eseguita facilmente con R, utilizzando l'ormai nota funzione 'lm()'.

```
model <- lm(yield ~ fert, data=dataset)
anova(model)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: yield
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## fert        3 115.000   38.333   16.429 0.0008821 ***
## Residuals    8  18.667    2.333
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

In questo caso, l'analisi della varianza ed il relativo test di F ci dicono che esiste una differenza significativa tra le medie, ma rimane il problema di classificare le soluzioni concimanti in ordine di efficacia. Chi è migliore di chi?



Per prima cosa, calcoliamo le medie dei trattamenti, utilizzando la funzione *emmeans()* del package *emmeans*:

```
library(emmeans)
medie <- emmeans(model, ~fert)
medie
##      fert      emmean      SE df lower.CL upper.CL
## Minerale      21.3 0.882   8      19.3      23.4
## Minerale lento  20.3 0.882   8      18.3      22.4
## Non concimato   13.3 0.882   8      11.3      15.4
## Organico        17.7 0.882   8      15.6      19.7
##
## Confidence level used: 0.95
```

Vediamo che l'output di R riporta anche gli errori standard delle medie (SEM) e gli intervalli di confidenza.

## 9.2 I contrasti

Si definisce CONTRASTO una combinazione lineare dei parametri di un modello (ad esempio le medie dei trattamenti), in modo che i coefficienti sommati diano 0. Ad esempio, considerando i parametri del modello precedente, una combinazione lineare del tipo:

$$C = \frac{1}{3} \cdot 21.33 + \frac{1}{3} \cdot 20.33 - 1 \cdot 13.33 + \frac{1}{3} \cdot 17.67 = 6.446667$$

è un contrasto, in quanto la somma dei coefficienti è:

$$C = \frac{1}{3} + \frac{1}{3} - 1 + \frac{1}{3} = 0$$

Al contrario una combinazione lineare del tipo:

$$C1 = 1 \cdot 21.33 + 1 \cdot 20.33 - 1 \cdot 13.33 + 1 \cdot 17.67$$

non è un contrasto valido, perché la somma dei coefficienti non è zero ( $1 + 1 - 1 + 1 = -2$ ).

Il primo contrasto C, ha un preciso significato biologico, in quanto stima la differenza tra il non fertilizzato e la media dei fertilizzati. Il risultato

è 6.45 e, con esso, possiamo rispondere a tutte e tre le domande elencate all'inizio:

1. La fertilizzazione (in media) ha un effetto diverso dal testimone non fertilizzato? Risposta: sì, perché la differenza è non nulla
2. La fertilizzazione in media è migliore/uguale/peggiore del testimone? Risposta: migliore, perché la differenza è positiva.
3. Quant'è la differenza tra il fertilizzato e il non-fertilizzato? Risposta: è pari a 6.45

E' evidente, tuttavia, che l'errore sperimentale produce incertezza, che sarebbe bene includere nei risultati, sotto forma di deviazione standard (errore standard) del contrasto, oppure come intervallo di confidenza.

### 9.2.1 Varianza del contrasto e test d'ipotesi

Ogni contrasto ha la sua varianza, ottenuta come combinazione lineare di varianze, attraverso il metodo di propagazione degli errori. Considerando che le medie sono, usualmente, indipendenti, la varianza di un contrasto tra medie è:

$$\text{var}(A\mu_1 + B\mu_2) = (A \cdot \sigma_{\mu_1})^2 + (B \cdot \sigma_{\mu_2})^2$$

dove A e B sono i coefficienti del contrasto,  $\mu_1$  e  $\mu_2$  sono due medie e  $\sigma_{\mu_1}$  e  $\sigma_{\mu_2}$  sono gli errori standard di  $\mu_1$  e  $\mu_2$ . Nel nostro caso, la varianza del contrasto è:

$$\text{var}(C) = \left(\frac{1}{3} \cdot 0.882\right)^2 + \left(\frac{1}{3} \cdot 0.882\right)^2 + (1 \cdot 0.882)^2 + \left(\frac{1}{3} \cdot 0.882\right)^2 = 1.037$$

mentre la deviazione standard (cioè l'errore standard) del contrasto è pari a:

$$ES(C) = \sqrt{1.037} = 1.0183$$

Insomma, per il contrasto C abbiamo una stima puntuale (6.45) e un errore standard (1.0183). Utilizzando questo errore standard possiamo calcolare

l'intervallo di confidenza del contrasto, secondo le metodiche usuali che abbiamo già visto in un capitolo precedente. Gli intervalli di confidenza dei contrasti sono trattati in modo più dettagliato in fondo al capitolo.

A questo punto potremmo chiederci: “E’ possibile che il contrasto, nella realtà, sia uguale a 0?”. Ovviamente è possibile: il nostro è solo un campione e, se ripetessimo il campionamento, potremmo ottenere valori di  $C$  totalmente diversi da quello effettivamente osservato. Poniamo l’ipotesi nulla in questi termini:

$$H_0 : K = 0$$

dove  $K$  è il valore ‘vero’ del contrasto, per le popolazioni che hanno generato i dati. Scriviamo la statistica:

$$T = \frac{C}{ES(C)} = \frac{6.45}{1.0183} = 6.331$$

Se l’ipotesi nulla è vera, che probabilità abbiamo di osservare  $T = 6.331$ ? In generale, il rapporto tra una stima ed il suo errore standard ha una distribuzione  $t$  di Student, con un numero di gradi di libertà pari a quelli del residuo dell’ANOVA. Di conseguenza possiamo saggiare l’ipotesi nulla che il contrasto è uguale a 0 calcolando la probabilità di trovare un valore di  $T$  pari o superiore (in valore assoluto) a quello da noi ottenuto. Nell’esempio sottostante abbiamo moltiplicato la probabilità trovata per 2, dato che si tratta di un test a due code:

```
t <- 6.4467 / 1.018277
2 * pt(t, 8, lower.tail = F)
## [1] 0.0002251554
```

Con questo abbiamo risposto a tutte e tre le nostre domande di ricerca:

1. Fertilizzare non produce lo stesso effetto che non fertilizzare;
2. Fertilizzare permette di produrre di più che non fertilizzare
3. la differenza è pari a 6.45 q/ha e ci sono elementi sufficienti per ritenere che essa sia diversa da 0.

### 9.2.2 I contrasti con R

Nel caso in esempio, si potrebbero pianificare tre contrasti (incluso quello già discusso):

1. non concimato vs concimato (in media)
2. concime organico vs. concimi minerali (in media)
3. minerale tradizionale vs. lento rilascio.

Per eseguire i contrasti con R, dobbiamo, in primo luogo, definire i vettori dei coefficienti. Per il primo contrasto, abbiamo già visto che questo vettore è:

```
m1 <- c(1/3, 1/3, -1, 1/3)
```

Per gli altri due contrasti, i coefficienti sono:

```
m2 <- c(0.5, 0.5, 0, -1)
```

```
m3 <- c(1, -1, 0, 0)
```

Una volta definiti i coefficienti, possiamo utilizzare il package ‘emmeans’, con la funzione ‘contrast()’, passandole, come argomento, l’oggetto ‘medie’, ottenuto con la funzione ‘emmeans()’ (vedi sopra), ed una lista contenente i tre vettori dei coefficienti (m1, m2, m3), ai quali si può assegnare un nome, ad esempio, C1, C2 e C3.

```
m1 <- c(1/3, 1/3, -1, 1/3)
m2 <- c(0.5, 0.5, 0, -1)
m3 <- c(1, -1, 0, 0)
contrast(medie, method=list(C1=m1, C2=m2, C3=m3),
         adjust="none")
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## C1             6.44 1.02  8 6.328  0.0002
## C2             3.17 1.08  8 2.932  0.0189
## C3             1.00 1.25  8 0.802  0.4458
```

Il test mostra che la concimazione ha, in media, un effetto significativo, che il concime organico differisce significativamente dai minerali (in media) e che il concime a lento rilascio non è significativamente diverso da quello normale.

### 9.3 I confronti multipli a coppie (pairwise comparisons)

Non sempre le prove sperimentali consentono di saggiare pochi contrasti pre-stabiliti, ma spesso è necessario confrontare tutte le possibili coppie di trattamenti (*pairwise comparisons*). In questo caso dovremmo definire un contrasto

per ogni coppia di medie, anche se l'impiego del package 'emmeans' agevola, non di poco, il lavoro.

In particolare, possiamo immaginare due situazioni di riferimento: tutti contro tutti (confronti tipo "Tukey") e tutti verso uno (confronti tipo "Dunnett"). Questo secondo tipo di contrasto può essere interessante, nel nostro caso, per verificare quale dei concimi consenta un incremento di produzione rispetto al testimone non concimato, qualora non sia necessario confrontare tra di loro le tesi concimanti.

Nell'esempio sottostante mostriamo un confronto tipo Tukey (tutti contro tutti), eseguito utilizzando la funzione 'contrast' (come sopra), passando il valore 'pairwise' all'argomento 'method'. Vediamo che ci sono sei contrasti a coppie.

```
#Confronti multipli a coppie
contrast(medie, adjust="none", method="pairwise")
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Minerale - Minerale lento 1.00 1.25 8 0.802 0.4458
## Minerale - Non concimato 8.00 1.25 8 6.414 0.0002
## Minerale - Organico 3.67 1.25 8 2.940 0.0187
## Minerale lento - Non concimato 7.00 1.25 8 5.612 0.0005
## Minerale lento - Organico 2.67 1.25 8 2.138 0.0650
## Non concimato - Organico -4.33 1.25 8 -3.474 0.0084
```

Per i confronti del tipo 'tutti verso uno' è possibile utilizzare la stessa funzione, assegnando però il valore 'dunnett' (invece che 'pairwise') all'argomento 'method'.

```
contrast(medie, adjust="none", method="dunnett")
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Minerale lento - Minerale -1.00 1.25 8 -0.802 0.4458
## Non concimato - Minerale -8.00 1.25 8 -6.414 0.0002
## Organico - Minerale -3.67 1.25 8 -2.940 0.0187
```

Purtroppo vediamo che R confronta tutte le tesi con 'Minerale' (primo livello in ordine alfabetico), mentre noi volevamo confrontare tutte le tesi con 'non concimato'. Per ottenere questo risultato dobbiamo ricodificare il vettore 'fert', in modo da definire 'Non concimato' come livello di riferimento. Per far questo si utilizza la funzione 'relevel()':

```
dataset$fert <- relevel(dataset$fert, ref="Non concimato")
```

A questo punto dobbiamo ripetere integralmente le analisi:

```

model <- lm(yield ~ fert, data=dataset)
medie <- emmeans(model, ~fert)
contrast(medie, adjust="none", method="dunnett")
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Minerale - Non concimato 8.00 1.25 8 6.414 0.0002
## Minerale lento - Non concimato 7.00 1.25 8 5.612 0.0005
## Organico - Non concimato 4.33 1.25 8 3.474 0.0084

```

## 9.4 Display a lettere

I risultati di un confronto multiplo a coppie (pairwise) possono essere presentati anche con un display a lettere, nel quale le medie seguite da lettere diverse sono significativamente diverse per un livello di probabilità di errore minore di quello dato.

Realizzare un display a letter manualmente è piuttosto facile, utilizzando la seguente procedura:

1. ordinare le medie in senso crescente/decescente
2. partire dalla prima media e aggiungere la lettera A a tutte quelle che non sono significativamente diverse
3. passare alla seconda media e aggiungere la lettera B a tutte quelle che non sono significativamente diverse
4. procedere analogamente con tutte le medie successive

Con R si può sfruttare il package ‘emmeans’, con la sintassi sottostante.

```

multcomp::cld(medie, adjust="none", Letters=LETTERS)
## fert emmean SE df lower.CL upper.CL .group
## Non concimato 13.3 0.882 8 11.3 15.4 A
## Organico 17.7 0.882 8 15.6 19.7 B
## Minerale lento 20.3 0.882 8 18.3 22.4 BC
## Minerale 21.3 0.882 8 19.3 23.4 C
##
## Confidence level used: 0.95
## significance level used: alpha = 0.05

```

## 9.5 Problemi di molteplicità: tassi di errore per confronto e per esperimento

Operando nel modo anzidetto, ogni contrasto/confronto ha una probabilità di errore del 5%. Se i contrasti/confronti sono più di uno ('famiglia' di  $n$  contrasti), la probabilità di sbagliarne almeno uno (*maximum experimentwise error rate*) è data da:

$$\alpha_E = 1 - (1 - \alpha_C)^n$$

Bisogna premettere che l'anzidetta formula vale quando i contrasti sono totalmente indipendenti tra loro, cosa che quasi mai avviene, dato che, anche in un semplice modello ANOVA, i contrasti condividono la stessa varianza d'errore e sono quindi più o meno correlati tra di loro. Con contrasti non indipendenti la formula anzidetta fornisce una sovrastima di  $\alpha_E$  (per questo si parla di *maximum experimentwise error rate*).

Il numero di confronti a coppie per esperimento può essere anche molto elevato: se ho  $k$  medie il numero dei confronti possibili è pari a  $k \cdot (k - 1)/2$ . Di conseguenza, la probabilità di errore per esperimento ( $\alpha_E$ ) può essere molto più alta del valore  $\alpha_C$  prefissato per confronto.

Ad esempio, se ho 15 medie, ho  $(15 \cdot 14)/2 = 105$  confronti possibili. Se uso  $\alpha_C = 0.05$  per ogni confronto, la probabilità di sbagliarne almeno uno è pari (in caso di confronti indipendenti) a  $1 - (1 - 0.05)^{105} = 0.995$ . Sostanzialmente, vi è pressoché la certezza che in questo esperimento qualcosa sia sbagliato!

### 9.5.1 Correzione per la molteplicità

Quando si elaborano i dati di un esperimento nel quale è necessario fare molti contrasti, o confronti, o, più in generale, molti test d'ipotesi simultanei, si potrebbe voler esprimere un giudizio globale (simultaneo) sull'intera famiglia di contrasti/confronti, minimizzando la possibilità che anche solo uno o pochi di essi siano sbagliati. Vediamo alcuni esempi di quando questo potrebbe capitare.

1. Non vogliamo correre rischi di escludere erroneamente alcun trattamento dal lotto dei migliori. Infatti, poniamo di voler trovare i migliori di  $k$  trattamenti, intendendo con ciò quelli che non sono significativamente

inferiori a nessun altro. In questa situazione, facendo ogni confronto con il 5% di probabilità di errore, la probabilità di escludere erroneamente anche solo un trattamento dal lotto dei migliori è molto più alta di quella prefissata, perché basta sbagliare anche uno solo dei  $k - 1$  confronti con il migliore.

2. Abbiamo utilizzato un display a lettere e intendiamo affermare che ‘i trattamenti seguiti da lettere diverse sono significativamente diversi’. In questo caso, stiamo tirando una conclusione basata sull’intera famiglia di confronti e non possiamo lecitamente riportare la probabilità di errore di un singolo confronto.

In tutte le condizioni analoghe a quelle più sopra accennate si pone il problema di aggiustare il p-level di ogni contrasto in modo da rispettare un certo livello prestabilito di protezione per esperimento (e non per confronto). Per far questo, si utilizzano metodi che, invece che essere basati sulla distribuzione di  $t$  di Student, estendono quest’ultima al caso multivariato. Non darò dettagli, in quanto i calcoli non sono eseguibili a mano; tuttavia è importante sottolineare che, in R, la correzione per la molteplicità viene eseguita di default, basta rimuovere dai comandi l’argomento ‘correct=“none”’.

```
contrast(medie, method="pairwise")
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Non concimato - Minerale -8.00 1.25 8 -6.414 0.0009
## Non concimato - Minerale lento -7.00 1.25 8 -5.612 0.0022
## Non concimato - Organico -4.33 1.25 8 -3.474 0.0342
## Minerale - Minerale lento 1.00 1.25 8 0.802 0.8518
## Minerale - Organico 3.67 1.25 8 2.940 0.0724
## Minerale lento - Organico 2.67 1.25 8 2.138 0.2203
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates
contrast(medie, method="dunnett")
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Minerale - Non concimato 8.00 1.25 8 6.414 0.0006
## Minerale lento - Non concimato 7.00 1.25 8 5.612 0.0014
## Organico - Non concimato 4.33 1.25 8 3.474 0.0219
##
## P value adjustment: dunnettx method for 3 tests
```

Possiamo notare che i p-values sono più alti di quelli che abbiamo ottenuto senza correzione; in questo caso stiamo rispettando il nostro livello di protezione a livello di esperimento, non a livello di singolo confronto.



## 9.6 E le classiche procedure di confronto multiplo?

Il confronto multiplo tradizionale è basato sul calcolo di una differenza critica minima, da utilizzare come base per il confronto tra due medie. In pratica, due medie sono considerate significativamente diverse quando la loro differenza supera la differenza critica. Nella letteratura scientifica si trovano molte procedure di confronto multiplo, tra le quali segnaliamo:

1. Minima Differenza Significativa (MDS o LSD)
2. *Honest Significant Difference* di Tukey
3. Test di Dunnett
4. Test di Duncan
5. Test di Newman-Keuls
6. Test di confronto multiplo di Tukey

Il primo metodo corrisponde esattamente a quello che abbiamo utilizzato all'inizio, per fare confronti multipli 'tutti contro tutti', senza correzione per la molteplicità. Il secondo e il terzo metodo corrispondono rispettivamente al test di confronto 'tutti verso tutti' e 'uno verso tutti' indicati in precedenza, con correzione per la molteplicità.

Non è necessario dettagliare gli altri test, in quanto, seppur siano ancora molto utilizzati, vengono ormai ritenuti obsoleti e sconsigliabili, da parecchi ricercatori. Chi vuole, trova altre informazioni in fondo al capitolo.

## 9.7 Consigli pratici

La cosa fondamentale è muoversi in coerenza con le finalità dell'esperimento. Si consiglia di:

1. Quando è possibile, pianificare gli esperimenti in modo da ottenere le risposte cercate con pochi contrasti di interesse. In questo modo il problema della molteplicità è minimizzato.
2. Non usare mai contrasti con serie di dati quantitative. In questo caso la regressione è l'approccio corretto e ne parleremo in un prossimo capitolo. In generale, utilizzare i contrasti solo se sono coerenti con la logica dell'esperimento.
3. Pianificare esattamente il numero di contrasti necessari ed eseguirli, fornendo il valore del contrasto e il suo errore standard.

4. Decidere è necessario aggiustare il p-level (e gli intervalli di confidenza) per la molteplicità (tasso di errore *comparisonwise* o *experimentwise*).
5. Se si decide di aggiustare il p-level, considerare che le procedure di Bonferroni o Sidak possono essere eccessivamente protette. Preferire quindi le procedure di aggiustamento basate sulla distribuzione t multivariata, il che, a livello di confronto multiplo con dati bilanciati, è equivalente ad utilizzare la Tukey HSD o il test di Dunnett.
6. Evitare le procedure di Duncan e Newmann-Keuls: non danno il livello di protezione cercato e, inoltre, non sono basate su una differenza critica costante (quindi sono difficili da discutere).

## 9.8 Per approfondire un po'...

### 9.8.1 Intervallo di confidenza di un contrasto

In precedenza, abbiamo calcolato la significatività dei contrasti con un test t di Student. Questo approccio all'analisi dei dati, estremamente comune nella pratica sperimentale, è da taluni ritenuto sub-optimale. Ad esempio, secondo il famoso statistico John Tukey, testare la significatività di un contrasto è sciocco<sup>1</sup> almeno per due motivi:

1. la domanda non è realistica: due trattamenti diversi o due gruppi di trattamenti diversi non possono che dare risultati diversi, magari in modo impercettibile, ma pur sempre diversi;
2. l'eventuale rifiuto dell'ipotesi nulla non ci dà nessuna informazione sulla rilevanza biologica della differenza, che è indipendente dalla sua significatività.

Pertanto, sempre secondo Tukey, è molto più rilevante parlare di *effect size*, cioè di ampiezza dell'effetto, da quantificare tramite un intervallo di confidenza. Le formule sono quelle usuali, tramite i quantili della distribuzione t di Student, con un numero di gradi di libertà pari a quello del residuo ANOVA. Ad esempio, per il primo contrasto, l'intervallo di confidenza è:

```
limSup <- 6.4467 + qt(0.975, 8) * 1.018277
limInf <- 6.4467 - qt(0.975, 8) * 1.018277
limInf; limSup
```

<sup>1</sup>All we know about the world teaches us that the effects of A and B are always different-in some decimal place-for any A and B. Thus asking "are the effects different?" is foolish.

```
## [1] 4.098549
## [1] 8.794851
```

Con R, possiamo utilizzare la funzione `confint()`, passandole l'oggetto `'medie'`, ottenuto come output della funzione `'emmeans()'`:

```
confint(contrast(medie, method=list(C1=m1, C2=m2, C3=m3),
               adjust="none"))
##   contrast estimate    SE df lower.CL upper.CL
##   C1          -2.889 1.02  8    -5.24   -0.541
##   C2          -0.333 1.08  8    -2.82    2.157
##   C3          -8.000 1.25  8   -10.88   -5.124
##
## Confidence level used: 0.95
```

L'uso degli intervalli di confidenza può essere preferibile al test d'ipotesi formale perché ci fa vedere l'entità degli effetti; ad esempio, possiamo vedere che la differenza tra il concime tradizionale e quello a lento rilascio (contrasto C3), anche se non significativa, potrebbe essere rilevante da un punto di vista agronomico (3.88 q/ha). In altri casi, differenze significative potrebbero risultare biologicamente irrilevanti.

Insomma, l'analisi statistica moderna sta un po' spostando l'attenzione dal P-level e dal test d'ipotesi formale, in favore di una più attenta valutazione dell' *'effect size'* e della rilevanza biologica delle differenze. Si tratta di una tendenza che va tenuta nella debita considerazione.

### 9.8.2 Correzione per la molteplicità: qualche dettaglio ulteriore

In questo capitolo, abbiamo mostrato come è possibile, con R, introdurre la correzione per la molteplicità, ma pensiamo che sia necessario fornire alcune informazioni aggiuntive. Prendiamo, per esempio, il dataset `'mixture'`, che abbiamo già utilizzato nel capitolo 7, che riguarda un esperimento nel quale sono poste a confronto quattro soluzioni erbicide per il diserbo del pomodoro. Le quattro medie, con gli errori standard, sono riproposte qui sotto.

```
library(aomisc)
library(emmeans)
data(mixture)
mod <- lm(Weight ~ Treat, data = mixture)
medie <- emmeans(mod, ~Treat)
medie
```

```
## Treat      emmean    SE df lower.CL upper.CL
## Metribuzin__348    9.18 1.96 12     4.91    13.4
## Mixture_378       5.13 1.96 12     0.86     9.4
## Rimsulfuron_30    16.86 1.96 12    12.59    21.1
## Unweeded         26.77 1.96 12    22.50    31.0
##
## Confidence level used: 0.95
```

I confronti multipli possibili sono sei (non molti quindi...) e sono eseguiti senza alcuna correzione per la molteplicità, con la funzione `contrast()`.

```
confronti <- contrast(medie, method = "pairwise",
                      adjust = "none")

confronti
## contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
## Metribuzin__348 - Mixture_378      4.05 2.77 12  1.461 0.1697
## Metribuzin__348 - Rimsulfuron_30   -7.68 2.77 12 -2.774 0.0168
## Metribuzin__348 - Unweeded        -17.60 2.77 12 -6.352 <.0001
## Mixture_378 - Rimsulfuron_30      -11.73 2.77 12 -4.235 0.0012
## Mixture_378 - Unweeded            -21.64 2.77 12 -7.813 <.0001
## Rimsulfuron_30 - Unweeded          -9.91 2.77 12 -3.578 0.0038
```

Immaginiamo che sia necessario adottare una correzione per la molteplicità, anche se il numero di confronti non è elevatissimo. La prima possibilità è quella di aggiustare il P-level per ogni confronto, in modo da diminuire la probabilità di errore per l'intera famiglia di sei confronti. In questo capitolo, abbiamo visto che la probabilità d'errore per esperimento ( $\alpha_E$ ) dipende dalla probabilità d'errore per confronto ( $\alpha_C$ ), secondo la formula seguente:

$$\alpha_E = 1 - (1 - \alpha_C)^n$$

dove  $n$  è il numero dei confronti. Pertanto, possiamo correggere il P-level con la formula anzidetta (metodo di Sidak). Prendiamo quindi la sesta colonna del dataframe `confronti`, quella che contiene i P-levels non corretti e la trasformiamo:

```
alphaC <- as.data.frame(confronti)[,6]
1 - (1 - alphaC)^6
## [1] 6.722991e-01 9.683462e-02 2.190543e-04 6.923077e-03 2.869757e-05
## [6] 2.255183e-02
```

Più facilmente, con il package `'emmeans'`:

```
contrast(medie, method = "pairwise", adjust = "sidak")
## contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
```

```
## Metribuzin__348 - Mixture_378      4.05 2.77 12  1.461 0.6723
## Metribuzin__348 - Rimsulfuron_30    -7.68 2.77 12 -2.774 0.0968
## Metribuzin__348 - Unweeded          -17.60 2.77 12 -6.352 0.0002
## Mixture_378 - Rimsulfuron_30        -11.73 2.77 12 -4.235 0.0069
## Mixture_378 - Unweeded              -21.64 2.77 12 -7.813 <.0001
## Rimsulfuron_30 - Unweeded           -9.91 2.77 12 -3.578 0.0226
##
## P value adjustment: sidak method for 6 tests
```

Vediamo che il secondo confronto, che era significativo, non è più tale adottando la correzione di Sidak.

Un'alternativa più nota (e semplice) è quella di utilizzare la disuguaglianza di Bonferroni:

$$\alpha_E = \alpha_C \cdot k$$

Quest'ultima è un po' più conservativa della precedente, nel senso che fornisce un P-level aggiustato leggermente più alto dell'altra.

```
alphaC*6
## [1] 1.018071e+00 1.009900e-01 2.190743e-04 6.943132e-03 2.869792e-05
## [6] 2.276671e-02
```

O meglio:

```
contrast(medie, method = "pairwise", adjust = "bonferroni")
## contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
## Metribuzin__348 - Mixture_378      4.05 2.77 12  1.461 1.0000
## Metribuzin__348 - Rimsulfuron_30    -7.68 2.77 12 -2.774 0.1010
## Metribuzin__348 - Unweeded          -17.60 2.77 12 -6.352 0.0002
## Mixture_378 - Rimsulfuron_30        -11.73 2.77 12 -4.235 0.0069
## Mixture_378 - Unweeded              -21.64 2.77 12 -7.813 <.0001
## Rimsulfuron_30 - Unweeded           -9.91 2.77 12 -3.578 0.0228
##
## P value adjustment: bonferroni method for 6 tests
```

Sono possibili altre procedure di aggiustamento del p-level (metodi di Holm, Hochberg, Hommel), ma nessuna di queste tiene conto della correlazione eventualmente esistente tra i contrasti e tutte quindi sono da definirsi più o meno 'conservative'.

Invece che aggiustare il P-level con uno dei metodi indicati più sopra è possibile considerare che, nel caso di contrasti e/o confronti, ogni singolo test d'ipotesi consiste in un rapporto tra una stima e il suo errore standard.

Se l'ipotesi nulla di non-significatività è vera, la sampling distribution è la distribuzione t di Student univariata. Di conseguenza, l'intera famiglia di confronti/contrast segue la distribuzione di t multivariato, con una matrice di correlazione che è deducibile dal contesto, come indicato da Bretz et al., (2011), pag. 73.

In altre parole, noto che sia il valore di t di ogni contrasto/confronto, posso desumere la relativa probabilità dalla distribuzione di t multivariata, invece che da quella univariata. Ovviamente il calcolo manuale è complesso e dovremo affidarci al software, come abbiamo già esemplificato più sopra:

```
#Confronti multipli a coppie, basati sul t multivariato
contrast(medie, method="pairwise")
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Metribuzin__348 - Mixture_378 4.05 2.77 12 1.461 0.4885
## Metribuzin__348 - Rimsulfuron_30 -7.68 2.77 12 -2.774 0.0698
## Metribuzin__348 - Unweeded -17.60 2.77 12 -6.352 0.0002
## Mixture_378 - Rimsulfuron_30 -11.73 2.77 12 -4.235 0.0055
## Mixture_378 - Unweeded -21.64 2.77 12 -7.813 <.0001
## Rimsulfuron_30 - Unweeded -9.91 2.77 12 -3.578 0.0173
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates
```

Possiamo notare che i p-levels sono leggermente più bassi di quelli ottenuti con Bonferroni, che conferma quindi di essere una procedura molto conservativa, mentre l'impiego del t multivariato consente di rispettare esattamente il tasso di errore 'per esperimento'.

Questo tipo di correzione, così come le altre, tiene conto del numero di confronti che vengono effettuati. Se ad esempio, volessimo eseguire un set di confronti tipo 'dunnett', cioè tutti verso uno, avremmo meno confronti e quindi una correzione più 'leggera'.

```
#Confronti multipli a coppie, basati sul t multivariato
contrast(medie, method="dunnett")
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Mixture_378 - Metribuzin__348 -4.05 2.77 12 -1.461 0.3711
## Rimsulfuron_30 - Metribuzin__348 7.68 2.77 12 2.774 0.0442
## Unweeded - Metribuzin__348 17.60 2.77 12 6.352 0.0001
##
## P value adjustment: dunnettx method for 3 tests
```

Nell'ottica esposta nel precedente sotto-capitolo, che prevede l'uso preferenziale degli intervalli di confidenza al posto del test d'ipotesi, è molto più interessante creare degli intervalli di confidenza *familywise*. Nel caso più semplice dei confronti a coppie nell'ANOVA per disegni ortogonali (bilanciati), si può utilizzare al posto del valore  $t_{\alpha/2, \nu}$  il valore ottenuto dalla distribuzione t multivariata, che, per nostra fortuna, si può facilmente desumere dalle tabelle dello 'Studentised Range', in funzione del numero di trattamenti in prova. Ad esempio, si può consultare questo link, da dove desumiamo che lo Studentised Range per 4 medie e 12 gradi di libertà dell'errore è 4.1985. Di conseguenza, se consideriamo ancora il secondo dei sei confronti a coppie illustrati in precedenza (Metribuzin\_348 vs. Rimsulfuron\_30; SE = 2.7702), l'intervallo di confidenza non corretto sarebbe:

```
limSup <- -7.6850 + qt(0.975, 12) * 2.770209
limInf <- -7.6850 + qt(0.025, 12) * 2.770209
limInf; limSup
## [1] -13.72077
## [1] -1.649233
```

Mentre l'intervallo di confidenza corretto sarebbe :

```
limSup <- -7.6850 + 1/sqrt(2) * 4.1985 * 2.770209
limInf <- -7.6850 - 1/sqrt(2) * 4.1985 * 2.770209
limInf; limSup
## [1] -15.90916
## [1] 0.5391627
```

Possiamo osservare che lo Studentised Range viene diviso per  $\sqrt{2}$ . Con R possiamo ottenere lo stesso risultato:

```
confint(contrast(medie, method="pairwise"))
## contrast estimate SE df lower.CL upper.CL
## Metribuzin__348 - Mixture_378 4.05 2.77 12 -4.18 12.272
## Metribuzin__348 - Rimsulfuron_30 -7.68 2.77 12 -15.91 0.539
## Metribuzin__348 - Unweeded -17.60 2.77 12 -25.82 -9.373
## Mixture_378 - Rimsulfuron_30 -11.73 2.77 12 -19.96 -3.508
## Mixture_378 - Unweeded -21.64 2.77 12 -29.87 -13.421
## Rimsulfuron_30 - Unweeded -9.91 2.77 12 -18.14 -1.688
##
## Confidence level used: 0.95
## Conf-level adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates
```

Nel caso dei confronti tutti contro uno (tipo Dunnet), l'intervallo di confidenza può essere analogamente calcolato con la distribuzione t-multivariata. Le tabelle da consultare in questo caso sono diverse, perché, a parità di numero

di medie, il numero di confronti è inferiore. Tuttavia, preferiamo utilizzare R:

```
confint(contrast(medie, method="dunnett"))
## contrast estimate SE df lower.CL upper.CL
## Mixture_378 - Metribuzin__348 -4.05 2.77 12 -11.541 3.45
## Rimsulfuron_30 - Metribuzin__348 7.68 2.77 12 0.192 15.18
## Unweeded - Metribuzin__348 17.60 2.77 12 10.104 25.09
##
## Confidence level used: 0.95
## Conf-level adjustment: dunnett method for 3 estimates
```

Sono possibili altre procedure di correzione più avanzate (Shaffer, Westfall), che tuttavia sono valide in presenza di alcune assunzioni aggiuntive e debbono quindi essere valutate con attenzione.

Per chiudere questo trattamento dei contrasti/confronti, vogliamo puntualizzare qualcosa che non sarà sfuggito ai lettori più esperti, cioè la differenza con le procedure di confronto multiplo tradizionale, basate sulla definizione di una differenza critica.

Esistono diversi metodi per calcolare una differenza critica; il più diffuso (Minima Differenza significativa di Fisher o *Least Significant Difference*, abbreviato MDS o LSD) impiega la distribuzione t di Student:

$$MDS = SED \times t_{\alpha/2; \nu}$$

Dove  $\alpha$  è il tasso di errore per confronto e  $\nu$  è il numero di gradi di libertà del residuo. Per dataset bilanciati, l'uso della MDS fornisce esattamente gli stessi risultati della funzione 'contrast()' utilizzata più sopra, con l'argomento 'adjust = "none" '.

Un'altra differenza critica molto utilizzata è la *Honest Significant Difference* di Tukey (per i confronti a coppie), che utilizza, invece della distribuzione t univariata, la distribuzione t multivariata. Questa procedura fornisce risultati analoghi a quelli della funzione 'contrast()', con aggiustamento per la molteplicità.

La differenza critica di Dunnett consente invece di confrontare tutte le medie con un testimone (o con il migliore/peggiore dei trattamenti), fornendo risultati analoghi a quelli ottenuti con la funzione 'contrasts(method = "dunnett")'.



Esistono almeno altre tre procedure classiche di confronto multiplo, che elenchiamo di seguito:

1. Test di Duncan;
2. Test di Newman-Keuls;
3. Test di confronto multiplo di Tukey.

In genere queste procedure sono sconsigliabili, per i seguenti motivi:

1. sono basate su differenze critiche multiple (crescenti al crescere della distanza dei trattamenti in graduatoria) e quindi non consentono la definizione di un'intervallo di confidenza. Di conseguenza, tra le domande 'biologiche' alle quali si cerca la risposta con i confronti multipli (si veda all'inizio) sono in grado di rispondere solo alla prima e non alla seconda e alla terza (non consentono il calcolo di un intervallo di confidenza).
2. Non danno protezione ne' per un tasso di errore per confronto ne' per esperimento, ma rimangono a metà strada, in modo imprecisato (quindi il  $p$  level non è effettivamente noto, né a livello di singolo confronto né a livello di intero esperimento).

### 9.8.3 Altre letture

Il riferimento definitivo è:

Hsu, J., 1996. Multiple comparisons. Theory and methods. Chapman and Hall.

Altre letture:

1. Bretz, F., T. Hothorn, and P. Westfall. 2002, On Multiple Comparison Procedures in R. R News 2: 14-17.
2. Calinsky, T. and L. C. A. Corsten. 1985, Clustering means in ANOVA by simultaneous testing. Biometrics, 41, 39-48.
3. Cargnelutti, A. F., L. Storck, L. A. Dal'Col, L. Pisaroglo de Carvalho, and P. Machado dos Santos. 2003, A precisao experimental relacionada ao uso de bordaduras nas extremidades das fileiras em ensaios de milho. Ciencia Rural 33: 607-614.
4. Carmer, S. G. and M. R. Swanson. 1971, Detection of difference between means: a Monte Carlo study of five pairwise multiple comparison procedures. Agronomy Journal, 63, 940-945.

5. Carmer, S. G. 1976, Optimal significance levels for application of the least significant difference in crop performance trials. *Crop Science*, 16, 95-99.
6. Chew, V. 1976, Comparing treatment means: a compendium. *Hortscience*, 11(4), 348-357.
7. Cousens, R. 1988, Misinterpretation of results in weed research through inappropriate use of statistics. *Weed Research*, 28, 281-289.
8. Edwards, A. W. F. and L. L. Cavalli-Sforza. 1965, A method for cluster analysis. *Biometrics*, 21, 362-375.
9. Gates, C. E. and J. D. Bilbro. 1978, Illustration of a cluster analysis method for mean separation. *Agronomy journal*, 70, 462-465.
10. O'Neill, R. and G. B. Wetherill. 1971, The present state of multiple comparison methods. *Journ. Roy. Stat. Soc.*, 2, 218-249.
11. Petersen, R. G. 1977, Use and misuse of multiple comparison procedures. *Agronomy Journal*, 69, 205-208.
12. Scott, A. J. and M. Knott. 1974, A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30, 507-512.
13. Willavize, S. A., S. G. Carmer, and W. M. Walker. 1980, Evaluation of cluster analysis for comparing treatment means. *Agronomy journal*, 72, 317-320.

## Capitolo 10

# Modelli ANOVA con fattori di blocco

Nel capitolo 7 abbiamo visto come è possibile costruire modelli nei quali abbiamo una sola variabile dipendente quantitativa e una variabile indipendente categorica. Abbiamo anche visto che questo tipo di modelli lineari sono normalmente noti come modelli ‘ANOVA’ ad una via e presuppongono che le unità sperimentali siano totalmente indipendenti tra loro. Per questo motivo, essi possono essere utilizzati solo con disegni sperimentali a randomizzazione completa, dove non esistano raggruppamenti di alcun tipo, escluso quello dettato dal trattamento in studio.

Ovviamente è possibile definire modelli analoghi, ma più complessi, nei quali introdurre anche l’effetto di eventuali *blocking factors*. Vediamo ora alcuni esempi

### 10.1 Caso-studio: confronto tra erbicidi in campo

Abbiamo una prova di confronto tra erbicidi in mais, con 13 formulati, due testimoni inerbiti (che, per comodità, considereremo due trattamenti diversi) e un testimone scerbato. Date le dimensioni della prova, è lecito ipotizzare che, pur scegliendo un appezzamento il più omogeneo possibile, ci potrebbero essere differenze di infestazione tra un punto e l’altro del campo, con un presumibile gradiente procedendo dai lati (vicino alle fosse) verso il centro. In

questa situazione, se l'esperimento fosse disegnato a randomizzazione completa, le differenze di infestazione tra una parte e l'altra del campo sarebbero trascurate e finirebbero per incrementare l'errore sperimentale, diminuendo l'efficienza dell'esperimento.

Si impiega quindi un disegno a blocchi randomizzati con quattro repliche. Ricordiamo che, con questo disegno, il campo è suddiviso in tante sezioni (dette blocchi) quante sono le repliche (quattro), perpendicolarmente al gradiente di infestazione trasversale. In questo modo, l'ambiente è relativamente omogeneo all'interno di ciascun blocco, nel quale viene collocata una replica per trattamento.

Per questa lezione è necessario caricare il package 'aomisc', che deve essere preventivamente installato, facendo riferimento, se necessario, al capitolo introduttivo. Il dataset dei risultati ('rimsulfuron') è, appunto, contenuto in questo package.

```
library(aomisc)
data(rimsulfuron)
```

Più sotto, riportiamo l'output di R relativo ai dati tabulati, con le relative medie di riga (trattamento) e di colonna (blocco)

##	1	2	3	4	Medie
## Alachlor + terbuthylazine	12.060	49.580	41.340	16.370	29.838
## Hand-Weeded	77.580	92.080	86.590	99.630	88.970
## Metolachlor + terbuthylazine (pre)	51.770	52.100	49.460	34.670	47.000
## Pendimethalin (post) + rimsulfuron (post)	94.820	87.720	102.050	101.940	96.632
## Pendimethalin (pre) + rimsulfuron (post)	65.510	88.720	95.520	82.390	83.035
## Rimsulfuron (40)	85.910	91.090	111.420	93.150	95.392
## Rimsulfuron (45)	93.030	105.000	89.190	79.040	91.565
## Rimsulfuron (50)	86.930	105.820	110.020	89.100	97.968
## Rimsulfuron (50+30 split)	71.360	77.570	115.910	92.160	89.250
## Rimsulfuron (60)	52.990	102.860	100.620	97.040	88.377
## Rimsulfuron + Atred	94.110	89.860	104.340	99.630	96.985
## Rimsulfuron + hoeing	73.220	86.060	118.010	98.320	93.903
## Rimsulfuron + thifensulfuron	75.280	82.590	94.960	85.850	84.670
## Thifensulfuron	78.470	42.320	62.520	24.340	51.913
## Unweeded 1	10.880	31.770	23.920	20.850	21.855
## Unweeded 2	27.580	51.550	25.130	38.610	35.718
## Medie	65.719	77.293	83.188	72.068	74.567

## 10.2 Definizione di un modello lineare

La produzione di ogni unità sperimentale (parcella) è condizionata da più di un effetto:

1. il diserbante con cui essa è stata trattata;

2. il blocco di cui essa fa parte;
3. ogni altro effetto non conoscibile e puramente casuale.

Il modello è quindi:

$$Y_{ij} = \mu + \gamma_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$$

dove  $Y$  è la produzione nel blocco  $i$  e con il diserbo  $j$ ,  $\mu$  è l'intercetta,  $\gamma$  è l'effetto del blocco  $i$ ,  $\alpha$  è l'effetto del trattamento  $j$  e  $\varepsilon$  è l'errore sperimentale per ogni singola parcella, che si assume normalmente distribuito, con media 0 e deviazione standard  $\sigma$ . Per gli usuali problemi di stimabilità, poniamo i vincoli  $\gamma_1 = 0$  e  $\alpha_1 = 0$  (vincolo sul trattamento), in modo che  $\mu$  rappresenta il valore atteso nel primo blocco e per il primo trattamento in ordine alfabetico. In totale, vi sono 19 parametri da stimare, più  $\sigma$ .

## 10.3 Stima dei parametri

### 10.3.1 Coefficienti del modello

La stima dei parametri viene eseguita con il metodo dei minimi quadrati. In questo caso l'esperimento è completamente bilanciato e la stima potrebbe essere fatta banalmente, considerando i valori osservati e le medie aritmetiche per gruppo. Infatti, se prendiamo la media generale, la media del primo blocco e la media del primo erbicida riportate nel codice sovrastante, vediamo che il primo erbicida, rispetto alla media generale, ha determinato un aumento di -44.729375 unità. D'altra parte, il primo blocco ha comportato un aumento di -8.848125 unità. Di conseguenza, il valore atteso nel primo trattamento e nel primo blocco dovrebbe essere pari a:

$$\bar{Y}_{11} = \mu = 74.56687 - 44.72937 - 8.848125 = 20.98937$$

Analogamente, considerando che la media del secondo blocco è di 2.72625 unità più alta della media generale, il valore atteso per il primo trattamento nel secondo blocco è pari a:

$$\bar{Y}_{12} = 74.56687 - 44.72937 + 2.72625 = 32.56375$$

Di conseguenza:

$$\gamma_2 = 32.56375 - 20.98937 = 11.57438$$

Ancora, considerando che la media del secondo trattamento è di 14.403125 unità più alta della media generale, il valore atteso per il secondo trattamento nel primo blocco è pari a:

$$\bar{Y}_{21} = 74.56687 + 14.40313 - 8.848125 = 80.12188$$

Di conseguenza:

$$\alpha_2 = 80.12188 - 20.98937 = 59.13251$$

Ovviamente, continuare questi calcoli è abbastanza tedioso e quindi eseguiamo il ‘model fitting’ con R, osservando che esso produce gli stessi risultati già calcolati a mano.

```
options(width = 170)
mod <- lm(Yield ~ factor(Block) + factor(Herbicide), data = rimsulfuron)
summary(mod)
##
## Call:
## lm(formula = Yield ~ factor(Block) + factor(Herbicide), data = rimsulfuron)
##
## Residuals:
```

	Min	1Q	Median	3Q	Max
##	-26.539	-8.740	1.102	6.209	35.406

```
##
## Coefficients:
```

	Estimate	Std. Error	t	v
## (Intercept)	20.989	6.886	3	
## factor(Block)2	11.574	4.468	2	
## factor(Block)3	17.469	4.468	3	
## factor(Block)4	6.349	4.468	1	
## factor(Herbicide)Hand-Weeded	59.133	8.936	6	
## factor(Herbicide)Metolachlor + terbuthylazine (pre)	17.163	8.936	1	
## factor(Herbicide)Pendimethalin (post) + rimsulfuron (post)	66.795	8.936	7	
## factor(Herbicide)Pendimethalin (pre) + rimsulfuron (post)	53.198	8.936	5	
## factor(Herbicide)Rimsulfuron (40)	65.555	8.936	7	
## factor(Herbicide)Rimsulfuron (45)	61.728	8.936	6	
## factor(Herbicide)Rimsulfuron (50)	68.130	8.936	7	
## factor(Herbicide)Rimsulfuron (50+30 split)	59.413	8.936	6	

```
## factor(Herbicide)Rimsulfuron (60) 58.540 8.936 6
## factor(Herbicide)Rimsulfuron + Atred 67.148 8.936 7
## factor(Herbicide)Rimsulfuron + hoeing 64.065 8.936 7
## factor(Herbicide)Rimsulfuron + thyfensulfuron 54.832 8.936 6
## factor(Herbicide)Thifensulfuron 22.075 8.936 2
## factor(Herbicide)Unweeded 1 -7.982 8.936 -0
## factor(Herbicide)Unweeded 2 5.880 8.936 0
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 12.64 on 45 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.8664, Adjusted R-squared:  0.8129
## F-statistic: 16.21 on 18 and 45 DF,  p-value: 4.916e-14
```

### 10.3.2 Residui e devianze

Nel capitolo 7 abbiamo visto come si calcolano i residui, sia a mano che con R. Abbiamo anche visto che la devianza dei residui è la somma dei loro quadrati:

```
RSS <- sum( residuals(mod)^2 )
RSS
## [1] 7187.348
```

Da questa possiamo ottenere la deviazione standard ( $\sigma$ ), considerando che i gradi di libertà si calcolano partendo dallo stesso punto da cui siamo partiti per l'ANOVA ad una via: abbiamo 16 gruppi con quattro repliche, per cui la devianza, entro ogni gruppo, ha tre gradi di libertà. In totale abbiamo quindi  $16 \times 3 = 48$  gradi di libertà anche se non dobbiamo dimenticare che, le repliche di ogni gruppo non differiscono solo per motivi casuali, ma anche perché appartengono a blocchi diversi. Abbiamo quattro blocchi, quindi tre gradi di libertà, che vanno dedotti dai 48 appena calcolati. Pertanto:

```
sigma <- sqrt(RSS/45)
sigma
## [1] 12.63799
```

Più facilmente:

```
summary(mod)$sigma
## [1] 12.63799
```

Da  $\sigma$  possiamo ottenere SEM e SED, anche se questo calcolo ve lo lascio per esercizio.

## 10.4 Scomposizione della varianza

La scomposizione della varianza è sequenziale ed analoga a quella che abbiamo operato per l'ANOVA ad una via; tuttavia, dobbiamo tener presente che, in questo caso, la devianza totale delle osservazione deve essere decomposta in tre quote: una dovuta al trattamento, una dovuta al blocco ed una dovuta agli effetti stocastici.

La devianza totale dei dati, con R, potrebbe essere ottenuta considerando un modello lineare in cui esiste solo l'intercetta, il che equivale a dire che i residui rappresentano gli scostamenti rispetto alla media generale. La devianza dei residui (somma dei quadrati) è quindi la devianza totale delle osservazioni:

```
mod1 <- lm(Yield ~ 1, data = rimsulfuron)
RSS1 <- sum( residuals(mod1)^2 )
RSS1
## [1] 53779.07
```

In seconda battuta, inseriamo l'effetto del blocco:

```
mod2 <- lm(Yield ~ factor(Block), data = rimsulfuron)
RSS2 <- sum( residuals(mod2)^2 )
RSS2
## [1] 51118.58
```

Vediamo che la devianza del residuo è calata di  $RSS1 - RSS2$  unità, che corrispondono all'effetto del blocco e alla sua introduzione nel modello.

Infine, inseriamo anche l'effetto del trattamento, tornando così al modello completo che abbiamo utilizzato più sopra. Considerando i paragrafi precedenti, notiamo che l'inserimento dell'effetto del trattamento ha determinato un calo della devianza dei residui pari  $RSS2 - RSS$ , che corrisponde appunto all'effetto del diserbo. Insomma, ogni effetto introdotto nel modello ha determinato un decremento della variabilità non spiegata, quantitativamente pari alla variabilità attribuibile all'effetto stesso. Alla fine del processo rimane comunque un certo residuo (RSS) non spiegato, corrispondente a  $\varepsilon$ .

Ci chiediamo se gli effetti attribuibili al blocco e al trattamento sono significativamente più grandi del residuo. Sappiamo già di non poter confrontare le devianze, ma possiamo calcolare e confrontare con un test di F le relative varianze. Basta tener conto che i gradi di libertà dei blocchi e dei trattamenti sono rispettivamente 3 e 15, cioè il numero dei blocchi meno uno e il numero dei trattamenti meno uno.



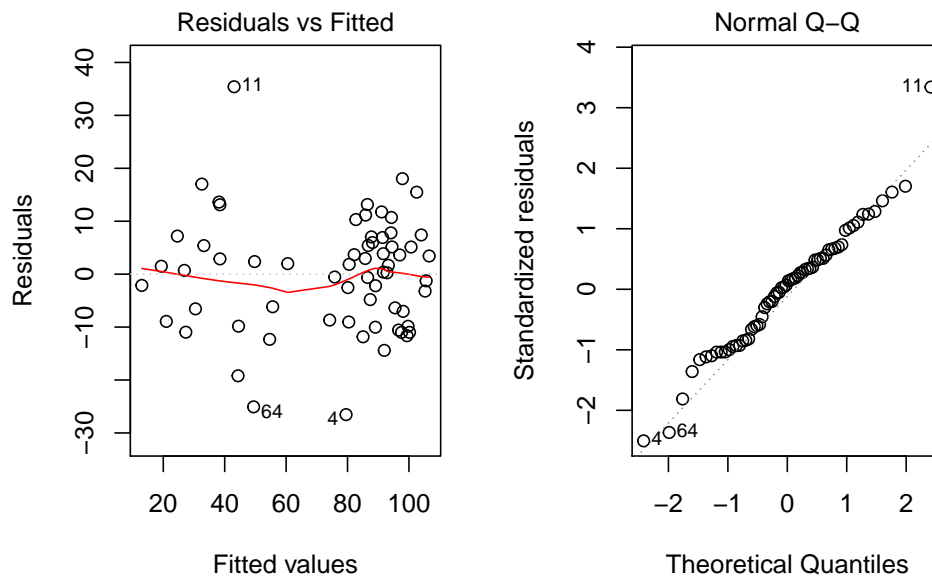


Figura 10.1: Analisi grafica dei residui per la prova di confronto erbicida

La tabella ANOVA può essere facilmente ottenuta con R:

```
anova(mod)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Yield
##
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## factor(Block)      3    2660   886.83   5.5524 0.002496 **
## factor(Herbicide)  15   43931  2928.75  18.3369 2.329e-14 ***
## Residuals         45    7187   159.72
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Ovviamente, prima di considerare questa tabella dovremo preoccuparci del fatto che le assunzioni di base siano rispettate, cosa che possiamo facilmente verificare con un'analisi grafica dei residui, utilizzando il codice sottostante. L'output è visibile in Figura 10.1.

```
par(mfrow=c(1,2))
plot(mod, which = 1)
plot(mod, which = 2)
```

Dopo esserci assicurati su questo importante aspetto, possiamo vedere che abbiamo due ipotesi nulle da testare (effetto del trattamento non significativo

ed effetto del blocco non significativo), che possono essere entrambe rifiutate per  $P < 0.05$ .

Da questo punto in avanti, l'analisi procede come usuale, calcolando le medie marginali attese ed, eventualmente, confrontandole tra loro con una procedura di confronto multiplo, come descritto nei capitoli precedenti. Tener presente che, in questo esperimento, abbiamo 16 trattamenti, cioè  $16 \times 15/2 = 120$  confronti; di conseguenza, può essere opportuno operare la correzione per la molteplicità. Inoltre, dato che il trattamento più interessante è quello che rende massima la produzione, sarà opportuno ordinare le medie in senso decrescente, utilizzando l'argomento 'reverse = T'.

```
library(emmeans)
medie <- emmeans(mod, ~factor(Herbicide))
multcomp::cld(medie, Letters = LETTERS, reverse = T)
```

Herbicide	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
Rimsulfuron (50)	98.0	6.32	45	85.24	110.7	A
Rimsulfuron + Atred	97.0	6.32	45	84.26	109.7	A
Pendimethalin (post) + rimsulfuron (post)	96.6	6.32	45	83.91	109.4	A
Rimsulfuron (40)	95.4	6.32	45	82.67	108.1	A
Rimsulfuron + hoeing	93.9	6.32	45	81.18	106.6	A
Rimsulfuron (45)	91.6	6.32	45	78.84	104.3	A
Rimsulfuron (50+30 split)	89.2	6.32	45	76.52	102.0	A
Hand-Weeded	89.0	6.32	45	76.24	101.7	A
Rimsulfuron (60)	88.4	6.32	45	75.65	101.1	A
Rimsulfuron + thifensulfuron	84.7	6.32	45	71.94	97.4	A
Pendimethalin (pre) + rimsulfuron (post)	83.0	6.32	45	70.31	95.8	AB
Thifensulfuron	51.9	6.32	45	39.19	64.6	BC
Metolachlor + terbutylazine (pre)	47.0	6.32	45	34.27	59.7	C
Unweeded 2	35.7	6.32	45	22.99	48.4	C
Alachlor + terbutylazine	29.8	6.32	45	17.11	42.6	C
Unweeded 1	21.9	6.32	45	9.13	34.6	C

```
##
## Results are averaged over the levels of: Block
## Confidence level used: 0.95
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 16 estimates
## significance level used: alpha = 0.05
```

Vi lascio il commento dei risultati come esercizio.

## 10.5 Disegni a quadrato latino

A volte i fattori di blocco sono più di uno e danno origine ad un disegno sperimentale detto ‘quadrato latino’ di cui abbiamo parlato nel capitolo 3. Qui, forniremo un esempio tratto dalla pratica sperimentale industriale.

## 10.6 Caso studio: confronto tra metodi costruttivi

Immaginiamo di voler studiare il tempo necessario per costruire un componente elettronico, utilizzando quattro metodi diversi. E’ evidente che il tempo di costruzione sarà influenzato dalla perizia del tecnico e, per questo, utilizziamo quattro tecnici diversi, ad ognuno dei quali facciamo utilizzare tutti e quattro i metodi. Un esperimento così disegnato sarebbe a blocchi randomizzati, con il tecnico che fa da blocco per i trattamenti. Tuttavia, dobbiamo anche riconoscere che i quattro tecnici saranno via via meno efficienti, e quindi il metodo che utilizzeranno per primo sarà avvantaggiato, mentre quello che utilizzeranno per ultimo sarà svantaggiato. E’ vero che i metodi sono assegnati in ordine random ad ogni tecnico, ma non si può comunque evitare che un metodo venga avvantaggiato rispetto ad un altro, perché, ad esempio, non viene mai ad occupare l’ultima posizione (o meglio, l’ultimo turno).

Per evitare questo problema imponiamo un vincolo ulteriore alla randomizzazione e facciamo in modo che ogni metodo occupi tutte e quattro i turni, in tecnici diversi. Il disegno è quindi a quadrato latino.

Il dataset dei risultati è disponibile su [gitHub](#):

```
path1 <- "https://raw.githubusercontent.com/OnofriAndreaPG/"
path2 <- "aomisc/master/data/"
fileName <- "Technicians.csv"
filePath <- paste(path1, path2, fileName, sep = "")
dataset <- read.csv(filePath, header=T)
dataset
##      Shift Technician Method Time
## 1      I      Andrew      C    90
## 2     II      Andrew      B    90
## 3    III      Andrew      A    89
## 4     IV      Andrew      D   104
```

## 5	I	Anna	D	96
## 6	II	Anna	C	91
## 7	III	Anna	B	97
## 8	IV	Anna	A	100
## 9	I	Michael	A	84
## 10	II	Michael	D	96
## 11	III	Michael	C	98
## 12	IV	Michael	B	104
## 13	I	Sarah	B	88
## 14	II	Sarah	A	88
## 15	III	Sarah	D	98
## 16	IV	Sarah	C	106

## 10.7 Definizione di un modello lineare

In questo caso abbiamo un trattamento (metodo) e due effetti ‘blocco’ (tecnico e turno) da includere nel modello, che può essere così definito:

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_k + \beta_j + \alpha_i + \varepsilon_{ijk}$$

dove  $\mu$  è l’intercetta,  $\gamma$  è l’effetto del turno  $k$ ,  $\beta$  è l’effetto del tecnico  $j$  e  $\alpha$  è l’effetto del metodo  $i$ . L’elemento  $\varepsilon_{ijk}$  rappresenta la componente random individuale, di ogni osservazione e si assume normalmente distribuita, con media 0 e deviazione standard  $\sigma$ .

Avendo già illustrato il processo di stima dei parametri e di scomposizione della varianza e quindi utilizziamo subito R per il ‘model fitting’:

```
mod <- lm(Time ~ Method + Technician
          + Shift, data = dataset)
```

Verifichiamo il rispetto delle assunzioni di base, con l’analisi grafica dei residui, riportata in Figura 10.2 (il codice è analogo a quello fornito più sopra).

Non essendovi evidenti problemi, valutiamo la significatività degli effetti nel modello, analogamente a quanto abbiamo fatto nel caso dell’ANOVA a blocchi randomizzati. L’unica differenza sta nel fatto che, nei disegni a quadrato latino, vi sono tre effetti da testare, anche se l’unico ad avere una certa rilevanza è l’effetto del metodo di lavoro.

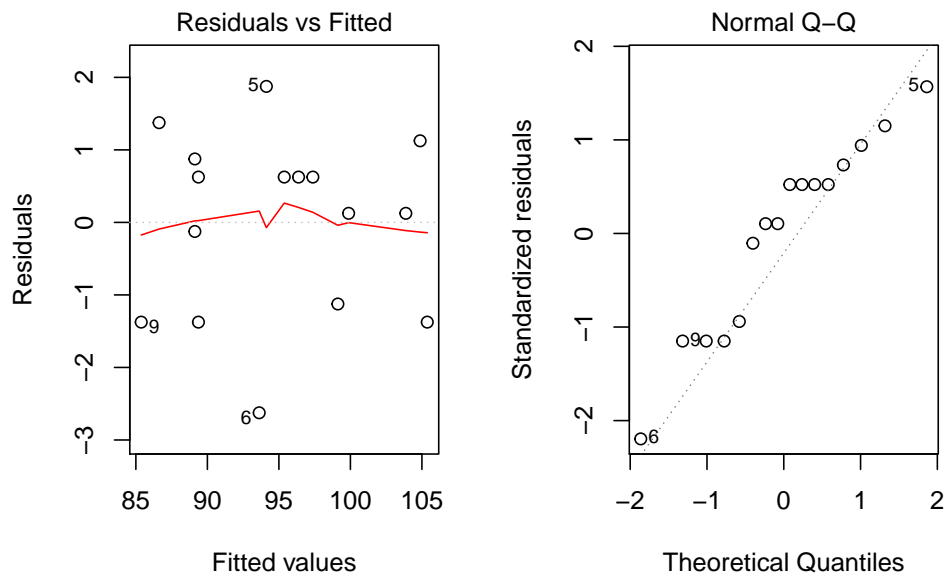


Figura 10.2: Analisi grafica dei residui per la prova di confronto tra metodi costruttivi

```
anova(mod)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Time
##          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## Method      3 145.69  48.563 12.7377 0.0051808 **
## Technician  3   17.19   5.729  1.5027 0.3065491
## Shift       3 467.19 155.729 40.8470 0.0002185 ***
## Residuals   6   22.87   3.812
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Vediamo che esiste una differenza significativa tra i metodi e l'ipotesi nulla può essere rifiutata con una bassissima probabilità di errore di prima specie.

Ovviamente, dopo aver eseguito un'ANOVA a blocchi randomizzati o a quadrato latino, andremo eventualmente ad eseguire un test di confronto multiplo, seguendo le raccomandazioni esposte nel capitolo precedente. Anche questa parte ve la lascio per esercizio.

# Capitolo 11

## Modelli ANOVA a due vie

### 11.1 Il concetto di 'interazione'

In alcuni casi potremmo essere interessati ad organizzare un esperimento per valutare l'effetto di due fattori sperimentali combinati (ad esempio la lavorazione del terreno ed il diserbo chimico), in modo da mettere in evidenza possibili "interazioni". Con questo termine intendiamo il fenomeno per cui l'effetto di un fattore (ad es. la lavorazione) cambia a seconda del livello dell'altro fattore (il diserbo chimico). Ad esempio, nella Tabella 11.1, A2 dà un risultato più elevato di A1, quando il secondo fattore sperimentale è B1, mentre la graduatoria è invertita con B2.

In termini algebrici, l'interazione può essere calcolata come mancanza di additività. Se guardiamo la tabella sovrastante, osserviamo che il trattamento A1 ha incrementato il risultato di 1.75 unità rispetto alla media generale, mentre il trattamento B1 ha incrementato il risultato di 0.25 unità, sempre rispetto alla media generale. Di conseguenza, per la combinazione A1B1 ci aspetteremmo un risultato finale additivo, pari a  $11.75 + 1.75 + 0.25 = 13.75$ ,

Tabella 11.1: Interazione tra due fattori sperimentali

	B1	B2	Media
A1	10	17.0	13.5
A2	14	6.0	10.0
Media	12	11.5	11.8

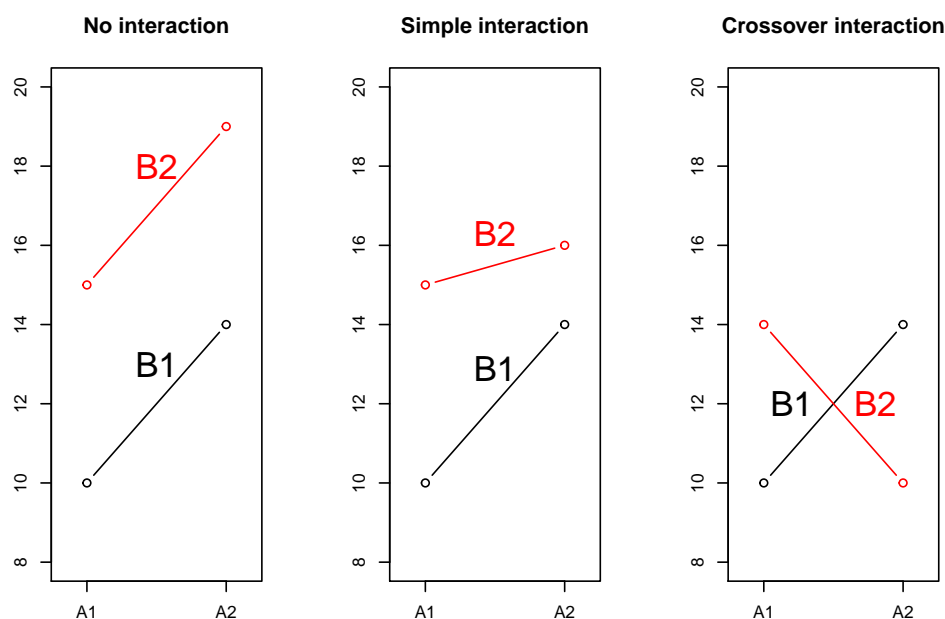


Figura 11.1: Esempi di interazione tra fattori sperimentali

mentre il risultato finale è di 10 unità. Evidentemente la combinazione A1B1 è una combinazione svantaggiosa, cioè i due trattamenti interagiscono tra di loro in modo negativo, portando ad un risultato inferiore alle attese.

La presenza di interazione può influenzare notevolmente l'interpretazione dei risultati. Infatti, tornandoci alla Tabella 11.1, se guardassimo solo alle medie marginali del fattore A, saremmo portati a concludere che i due livelli A1 ed A2 forniscono, più o meno, gli stessi risultati. In realtà questo è falso, in quanto A1 ed A2 forniscono risultati molto diversi, ma le differenze sono di segno opposto, a seconda del livello di B.

## 11.2 Tipi di interazione

In genere, abbiamo due tipi di interazione: quella in cui cambia la graduatoria tra i trattamenti (interazione crossover) e quella in cui vi è solo una modifica dell'entità dell'effetto (interazione semplice o non-crossover). I due tipi di interazione sono esemplificati in Figura 11.1. Da un punto di vista dell'interpretazione dei risultati, l'interazione cross-over è particolarmente importante, perché non consente di raggiungere conclusioni generali per i due fattori sperimentali presi indipendentemente l'uno dall'altro.

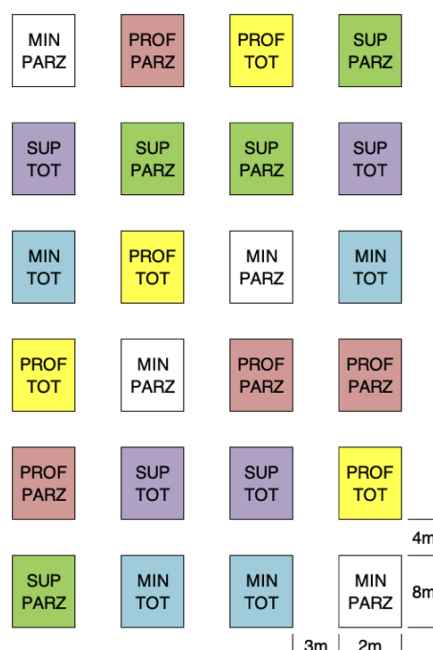


Figura 11.2: Mappa dell'esperimento fattoriale a blocchi randomizzati

### 11.3 Caso-studio: interazione tra lavorazioni e diserbo chimico

Un ricercatore ha organizzato un esperimento fattoriale a blocchi randomizzati, dove ha valutato l'effetto di tre tipi di lavorazione del terreno (lavorazione minima = MIN; aratura superficiale = SUP; aratura profonda = PROF) e di due tipi di diserbo chimico (a pieno campo = TOT; localizzato sulla fila della coltura = PARZ). L'ipotesi scientifica è che, in caso di diserbo localizzato, il rovesciamento del terreno prodotto dall'aratura sia fondamentale, in quanto sotterra i semi prodotti dalle piante infestanti, impedendone l'emergenza nella coltura successiva e rendendo quindi necessario il diserbo a tutta superficie. La mappa di campo è presentata in Figura 11.2; dobbiamo notare lo spazio lasciato tra una parcella e l'altra, per permettere l'uso e la circolazione delle macchine per la lavorazione.

In totale, l'esperimento include sei tesi (le sei possibili combinazioni tra i due fattori sperimentali) e quattro repliche per un totale di 24 parcelle. Come consuetudine in pieno campo, l'esperimento è organizzato a blocchi randomizzati e le sei tesi sperimentali sono allocate a caso all'interno di ciascun



blocco.

I risultati ottenuti con questo esperimento sono disponibili nel file ‘beet.csv’, che può essere aperto direttamente da gitHub, con il codice sottostante.

```
path1 <- "https://raw.githubusercontent.com/OnofriAndreaPG/"
path2 <- "aomisc/master/data/"
name <- "beet.csv"
pathName <- paste(path1, path2, name, sep = "")
dataset <- read.csv(pathName, header=T)
head(dataset)
##   Lavorazione Diserbo Blocco   Prod
## 1          MIN     tot      1 11.614
## 2          MIN     tot      2  9.283
## 3          MIN     tot      3  7.019
## 4          MIN     tot      4  8.015
## 5          MIN    parz      1  5.117
## 6          MIN    parz      2  4.306
```

## 11.4 Definizione del modello lineare

I risultati di questo esperimento sono determinati da quattro elementi ‘deterministici’:

1. l’effetto del blocco
2. l’effetto della lavorazione
3. l’effetto del diserbo chimico
4. l’interazione ‘lavorazione  $\times$  diserbo’

Un modello lineare con questi quattro effetti potrebbe essere scritto:

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_k + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dove  $\gamma$  è l’effetto del blocco  $k$ ,  $\alpha$  è l’effetto della lavorazione  $i$ ,  $\beta$  è l’effetto del diserbo  $j$ ,  $\alpha\beta$  è l’effetto dell’interazione per la specifica combinazione della lavorazione  $i$  e del diserbo  $j$ . Oltre a questi elementi ‘deterministici’ i risultati sono influenzati dall’elemento stocastico  $\varepsilon$ , associato ad ogni osservazione, che si assume normalmente distribuito con media 0 e deviazione standard pari a  $\sigma$ .

## 11.5 Stima dei parametri

Per rendere ‘stimabili’ i parametri, poniamo un vincolo sul trattamento, per cui  $\gamma_1 = 0$ ,  $\alpha_1 = 0$  (primo livello in ordine alfabetico, cioè MIN),  $\beta_1 = 0$  (primo livello in ordine alfabetico, cioè PARZ). Per quanto riguarda l’interazione  $\alpha\beta$ , abbiamo 6 combinazioni possibili tra il primo e il secondo fattore (MIN - TOT, MIN - PARZ, SUP - TOT, SUP - PARZ, PROF - TOT, PROF - PARZ); di queste, dobbiamo vincolare tutte le combinazioni che contengono il primo livello in ordine alfabetico per uno dei due fattori (MIN - TOT, MIN - PARZ, SUP - PARZ, PROF - PARZ, corrispondenti ad  $\alpha\beta_{1,1} = \alpha\beta_{1,2} = \alpha\beta_{2,1} = \alpha\beta_{3,1} = 0$ ).

Con questi vincoli,  $\mu$  è il valore atteso per la parcella localizzata nel primo blocco e trattata con il primo livello in ordine alfabetico per tutti i fattori sperimentali ( $\bar{Y}_{111}$ ). I tre valori  $\gamma$  rappresentano rispettivamente  $\gamma_2 = \bar{Y}_{112} - \bar{Y}_{111}$ ,  $\gamma_3 = \bar{Y}_{113} - \bar{Y}_{111}$  e  $\gamma_4 = \bar{Y}_{114} - \bar{Y}_{111}$ . Abbiamo invece che  $\alpha_2 = \bar{Y}_{211} - \bar{Y}_{111}$  e  $\alpha_3 = \bar{Y}_{311} - \bar{Y}_{111}$ , mentre  $\beta_2 = \bar{Y}_{121} - \bar{Y}_{111}$  e  $\beta_3 = \bar{Y}_{131} - \bar{Y}_{111}$ . Per quanto riguarda l’interazione, abbiamo due soli parametri da stimare, per i quali possiamo fare le seguenti considerazioni:

$$\bar{Y}_{111} = \mu + \alpha_1 + \beta_1 + \alpha\beta_{11} = \mu$$

$$\bar{Y}_{221} = \mu + \alpha_2 + \beta_2 + \alpha\beta_{22}$$

quindi:

$$\bar{Y}_{221} - \bar{Y}_{111} = \alpha_2 + \beta_2 + \alpha\beta_{22}$$

da cui:

$$\alpha\beta_{22} = \bar{Y}_{221} - \bar{Y}_{111} - \alpha_2 - \beta_2$$

Analogamente:

$$\alpha\beta_{32} = \bar{Y}_{321} - \bar{Y}_{111} - \alpha_3 - \beta_2$$

Vediamo che, quando i modelli divengono appena appena più complessi, la parametrizzazione con vincolo sulla somma diventa abbastanza controintuitiva, e, inoltre, la stima dei parametri diventa abbastanza difficile da fare a

mano. Al contrario, quest'operazione è piuttosto semplice e intuitiva quando si impieghi il vincolo sulla somma. Per chi volesse approfondire, ci sono alcune ulteriori informazioni in fondo al capitolo.

In questa sede, per la stima dei parametri ci affidiamo ad R e al metodo dei minimi quadrati, confidando che le informazioni precedenti possano essere utili a capire l'output del programma.

```
mod <- lm(Prod ~ factor(Blocco) + Lavorazione + Diserbo +
          Lavorazione:Diserbo, data=dataset)
summary(mod)
##
## Call:
## lm(formula = Prod ~ factor(Blocco) + Lavorazione + Diserbo +
##     Lavorazione:Diserbo, data = dataset)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.78329 -0.78754 -0.04437  0.31117  3.12546
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)      6.6422     0.8376   7.930 9.59e-07 ***
## factor(Blocco)2    -1.0380     0.7897  -1.314 0.208431
## factor(Blocco)3    -0.8277     0.7897  -1.048 0.311179
## factor(Blocco)4    -0.7232     0.7897  -0.916 0.374267
## LavorazionePROF     4.6338     0.9671   4.791 0.000238 ***
## LavorazioneSUP      2.4803     0.9671   2.565 0.021568 *
## Diserbotot         2.9878     0.9671   3.089 0.007480 **
## LavorazionePROF:Diserbotot -4.4098     1.3677  -3.224 0.005677 **
## LavorazioneSUP:Diserbotot  -2.3218     1.3677  -1.698 0.110246
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 1.368 on 15 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.641, Adjusted R-squared:  0.4495
## F-statistic: 3.348 on 8 and 15 DF, p-value: 0.02095
```

Una volta stimati i parametri, possiamo individuare la devianza residua, come somma dei quadrati degli scarti tra i valori attesi e i valori osservati. I residui, in R, possono essere ottenuti con la funzione 'residuals()'.

```
RSS <- sum( residuals(mod)^2 )
RSS
```

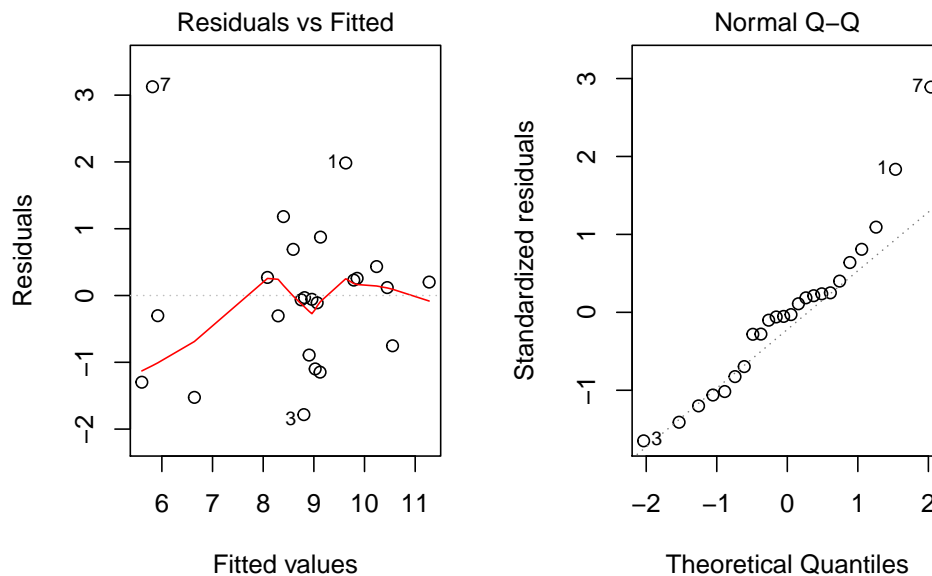


Figura 11.3: Analisi grafica dei residui con R

```
## [1] 28.06087
```

Consideriamo che la devianza del residuo ha un numero di gradi di libertà pari alla differenza tra il numero dei dati e il numero dei parametri stimati ( $24 - 9 = 15$ ). Di conseguenza, possiamo stimare  $\sigma$ , come:

```
sqrt(RSS/15)
```

```
## [1] 1.367744
```

o, più velocemente, con l'apposito estrattore:

```
summary(mod)$sigma
```

```
## [1] 1.367744
```

## 11.6 Verifica delle assunzioni di base

Dobbiamo quindi procedere con la verifica delle assunzioni di base, attraverso l'analisi grafica dei residui, come indicato in un capitolo precedente. Il grafico dei residui contro i valori attesi ed il QQ-plot sono riportati in Figura 11.3.

Il grafico dei residui mostra un sospetto outlier (il settimo dato). Tuttavia, non abbiamo memoria di errori durante la sperimentazione e a parte questo outlier, non paiono esserci problemi di omogeneità delle varianze. Pertanto,

decidiamo di ignorare questo potenziale dato aberrante e proseguire nell'analisi, in quanto non sussistono particolari elementi che facciano sospettare qualche patologia dei dati più o meno rilevante.

## 11.7 Scomposizione delle varianze

Se dovessimo scomporre le varianze manualmente, potremmo costruire il modello in modo sequenziale, il che è totalmente corretto con i disegni bilanciati come il nostro.

```
mod0 <- lm(Prod ~ 1, data=dataset)
mod1 <- lm(Prod ~ factor(Blocco), data=dataset)
mod2 <- lm(Prod ~ factor(Blocco) + Lavorazione, data=dataset)
mod3 <- lm(Prod ~ factor(Blocco) + Lavorazione + Diserbo,
           data=dataset)
mod4 <- lm(Prod ~ factor(Blocco) + Lavorazione + Diserbo +
           Lavorazione:Diserbo, data=dataset)
RSS0 <- deviance(mod0)
RSS1 <- deviance(mod1)
RSS2 <- deviance(mod2)
RSS3 <- deviance(mod3)
RSS4 <- deviance(mod4)
```

Vediamo che il modello nullo ha un residuo pari a 78.161505, mentre il modello con il solo effetto del blocco ha un residuo più basso e pari 74.5019152. Evidentemente, l'introduzione del blocco ha migliorato la capacità descrittiva del modello e l'effetto di questa variabile può essere quantificato con la differenza tra le due devianze:

```
RSS0 - RSS1
## [1] 3.65959
```

Analogamente, l'effetto della lavorazione (devianza della lavorazione) è dato da:

```
RSS1 - RSS2
## [1] 23.65647
```

Ovviamente, possiamo evitare di procedere in questo modo, sfruttando le funzionalità di R e, in particolare, la funzione `'anova()'`:

```
anova(mod)
## Analysis of Variance Table
```

```
##
## Response: Prod
##               Df  Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## factor(Blocco)   3   3.6596   1.2199   0.6521 0.59389
## Lavorazione      2  23.6565  11.8282   6.3228 0.01020 *
## Diserbo          1   3.3205   3.3205   1.7750 0.20266
## Lavorazione:Diserbo 2  19.4641   9.7321   5.2023 0.01922 *
## Residuals       15  28.0609   1.8707
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

La quantificazione dei gradi di libertà dovrebbe essere chiara; aggiungiamo solo che, in generale, i gradi di libertà di un'interazione sono pari al prodotto tra i gradi di libertà degli effetti da cui essa è composta e coincidono con il numero di parametri stimati (in questo caso due).

Nel leggere una tabella ANOVA a due (o più) vie, è **fondamentale procedere dal basso verso l'alto**, in quanto la presenza di un'interazione significativa rende non-informative sia le significanze degli effetti principali, sia le medie marginali. Infatti, come abbiamo visto all'inizio, vi possono essere casi in cui le medie marginali sono simili, ma ciò è dovuto alla presenza di un'interazione cross-over. In questo caso, essendo significativa l'interazione tra lavorazione e diserbo, dovremo considerare e confrontare le sei medie per le combinazioni tra questi due fattori sperimentali.

## 11.8 Medie marginali attese

Può essere interessante vedere come si costruiscono le medie marginali attese, con un attento uso dei contrasti. Ad esempio, le medie attese per le sei combinazioni 'lavorazione x diserbo' possono essere ottenute considerando che  $\mu$  è il valore atteso per MIN-PARZ nel primo blocco, mentre  $\mu + \gamma_2$  è il valore atteso per MIN-PARZ nel secondo blocco, e così via. Di conseguenza, la media per la combinazione MIN-PARZ sarà pari a:

$$\frac{\mu + (\mu + \gamma_2) + (\mu + \gamma_3) + (\mu + \gamma_4)}{4} = \mu + \frac{1}{4}\gamma_2 + \frac{1}{4}\gamma_3 + \frac{1}{4}\gamma_4$$

I parametri stimati sono derivabili con la funzione 'coef()', quindi la combinazione lineare sopra indicata può essere ottenuta come segue:

```
coef(mod)[1] + 1/4*coef(mod)[2] + 1/4*coef(mod)[3] + 1/4*coef(mod)[4]
## (Intercept)
##      5.995
```

Ovviamente, è più conveniente costruire una vettore con i coefficienti del contrasto, e moltiplicare per il vettore dei parametri stimati, come segue:

```
k1 <- c(1, 1/4, 1/4, 1/4, 0, 0, 0, 0, 0)
sum( coef(mod) * k1 )
## [1] 5.995
```

Le altre medie, possono essere ottenute analogamente.

```
k2 <- c(1, 1/4, 1/4, 1/4, 1, 0, 0, 0, 0) #PROF - PARZ
k3 <- c(1, 1/4, 1/4, 1/4, 0, 1, 0, 0, 0) #SUP - PARZ
k4 <- c(1, 1/4, 1/4, 1/4, 0, 0, 1, 0, 0) #MIN - TOT
k5 <- c(1, 1/4, 1/4, 1/4, 1, 0, 1, 1, 0) #PROF - TOT
k6 <- c(1, 1/4, 1/4, 1/4, 0, 1, 1, 0, 1) #SUP - TOT
sum( coef(mod) * k2 )
## [1] 10.62875
sum( coef(mod) * k3 )
## [1] 8.47525
sum( coef(mod) * k4 )
## [1] 8.98275
sum( coef(mod) * k5 )
## [1] 9.20675
sum( coef(mod) * k6 )
## [1] 9.14125
```

Anche se è comodo conoscere come eseguire queste operazioni, da un punto di vista pratico è certamente più comodo utilizzare la funzione ‘emmeans()’ del package ‘emmeans’, di cui daremo un esempio tra poco.

## 11.9 Calcolo degli errori standard (SEM e SED)

Tutte le quantità ottenute più sopra sono state calcolate come combinazioni lineari di parametri del modello. Di conseguenza, le loro varianze sono derivabili con la legge di propagazione degli errori. In questo caso semplice (dati bilanciati), possiamo utilizzare la usuale formula per la quale l’errore standard di una media si ottiene dalla radice quadrata del rapporto tra la varianza del residuo e il numero delle repliche.

Tuttavia, anche se la varianza del residuo è la stessa, il numero di dati che concorrono a formare le medie è diverso (diverso numero di repliche). Infatti, le medie di ogni combinazione ‘diserbo x lavorazione’ hanno un numero di repliche pari a quattro, mentre le lavorazioni hanno un numero di repliche pari a quattro per il numero dei livelli di diserbo (cioè 8). Il diserbo ha invece un numero di repliche pari a quattro per il numero dei livelli di lavorazione (cioè 12).

Di conseguenza:

$$SEM_A = \sqrt{\frac{1.87}{4 \cdot 2}} = 0.483$$

$$SEM_B = \sqrt{\frac{1.87}{4 \cdot 3}} = 0.395$$

$$SEM_{AB} = \sqrt{\frac{1.87}{4}} = 0.684$$

Possiamo notare che le medie degli effetti principali, grazie al numero di repliche più elevato, sono stimate con maggiore precisione delle medie delle combinazioni.

Per quanto riguarda gli errori standard delle differenze tra medie (SED), questi si ottengono dai SEM, moltiplicandoli per  $\sqrt{2}$ , come usuale. Dai SED, posso calcolare le Minime Differenze Significative, moltiplicandoli per il valore di t di Student, per il 5% di probabilità (test a due code) e 15 gradi di libertà, pari a 2.131.

Dato che l’interazione è significativa, posso fare i confronti multipli solo tra le medie delle combinazioni ‘diserbo x lavorazione’, dato che confrontare le medie degli effetti principali potrebbe portare a risultati poco attendibili, per i motivi precedentemente esposti.

## 11.10 Medie marginali attese e confronti multipli con R

Per ottenere medie, confronti multipli o altre analisi routinarie, possiamo utilizzare il package ‘emmeans’. Il codice sottostante calcola le medie per le



combinazioni 'lavorazione x diserbo' e confronta i diserbi a parità di lavorazione.

```
library(emmeans)
medie <- emmeans(mod, ~Diserbo|Lavorazione)
multcomp::cld(medie, adjust="none", Letters=LETTERS)
## Lavorazione = MIN:
## Diserbo emmean    SE df lower.CL upper.CL .group
## parz          6.00 0.684 15      4.54      7.45  A
## tot           8.98 0.684 15      7.53     10.44  B
##
## Lavorazione = PROF:
## Diserbo emmean    SE df lower.CL upper.CL .group
## tot           9.21 0.684 15      7.75     10.66  A
## parz          10.63 0.684 15      9.17     12.09  A
##
## Lavorazione = SUP:
## Diserbo emmean    SE df lower.CL upper.CL .group
## parz           8.48 0.684 15      7.02      9.93  A
## tot           9.14 0.684 15      7.68     10.60  A
##
## Results are averaged over the levels of: Blocco
## Confidence level used: 0.95
## significance level used: alpha = 0.05
```

Se volessimo confrontare le lavorazioni a parità di diserbo o tutte le combinazioni dovremmo utilizzare codice leggermente diverso:

```
medie <- emmeans(mod, ~Lavorazione|Diserbo)
multcomp::cld(medie, adjust="none", Letters=LETTERS)
## Diserbo = parz:
## Lavorazione emmean    SE df lower.CL upper.CL .group
## MIN              6.00 0.684 15      4.54      7.45  A
## SUP              8.48 0.684 15      7.02      9.93  B
## PROF             10.63 0.684 15      9.17     12.09  C
##
## Diserbo = tot:
## Lavorazione emmean    SE df lower.CL upper.CL .group
## MIN              8.98 0.684 15      7.53     10.44  A
## SUP              9.14 0.684 15      7.68     10.60  A
## PROF             9.21 0.684 15      7.75     10.66  A
##
## Results are averaged over the levels of: Blocco
## Confidence level used: 0.95
```

```
## significance level used: alpha = 0.05
medie <- emmeans(mod, ~Lavorazione:Diserbo)
multcomp::cld(medie, adjust="none", Letters=LETTERS)
##   Lavorazione Diserbo emmean      SE df lower.CL upper.CL .group
##   MIN           parz      6.00 0.684 15      4.54      7.45      A
##   SUP           parz      8.48 0.684 15      7.02      9.93      B
##   MIN           tot       8.98 0.684 15      7.53     10.44     BC
##   SUP           tot       9.14 0.684 15      7.68     10.60     BC
##   PROF          tot       9.21 0.684 15      7.75     10.66     BC
##   PROF          parz     10.63 0.684 15      9.17     12.09      C
##
## Results are averaged over the levels of: Blocco
## Confidence level used: 0.95
## significance level used: alpha = 0.05
```

In questo caso non c'è nessuna differenza, dato che non abbiamo implementato nessuna correzione per la molteplicità. Altrimenti, le tre situazioni sarebbero diverse, in quanto nel primo caso avremmo fatto solo tre confronti, nel secondo caso ne avremmo fatti sei, nel terzo caso 15, con un diverso livello di correzione per la molteplicità.

## 11.11 Per approfondire un po'....

### 11.11.1 Anova a due vie: scomposizione 'manuale' della varianza

Anche nel caso dell'ANOVA a due vie, illustriamo i calcoli necessari per la scomposizione 'manuale' della varianza. Il punto di partenza, come al solito, sono le medie per i livelli di ogni fattore sperimentale e per le loro combinazioni, che sono date più sotto, in forma di matrici (ma nessuna paura, è solo per comodità!).

Le medie delle combinazioni 'lavorazioni  $\times$  diserbo' sono:

$$\bar{Y}_{ij} = \begin{bmatrix} 5.99500 & 8.98275 \\ 10.62875 & 9.20675 \\ 8.47525 & 9.14125 \end{bmatrix}$$

Per le lavorazioni e per i diserbi abbiamo:

$$\bar{Y}_{i..} = \begin{bmatrix} 7.488875 \\ 9.917750 \\ 8.808250 \end{bmatrix}$$

$$\bar{Y}_{.j.} = \begin{bmatrix} 7.488875 \\ 9.917750 \\ 8.808250 \end{bmatrix}$$

Le medie dei blocchi, sono, invece:

$$\bar{Y}_{..k} = \begin{bmatrix} 9.385500 \\ 8.347500 \\ 8.557833 \\ 8.662333 \end{bmatrix}$$

La media generale è  $\bar{Y}_{...} = 8.738292$ .

Per calcolare le devianze degli effetti principali (blocchi, lavorazioni e diserbi), come primo passaggio, calcoliamo gli scostamenti tra le medie e la media generale e, quindi, sottraiamo da ogni media la media generale. Ricordiamo che questi scarti non sono altro che gli effetti dei trattamenti e, nel caso in cui si sia adottata un vincolo sulla somma, questi coincidono con i parametri di un modello lineare. Per cui:

$$\bar{Y}_{i..} - \bar{Y}_{...} = \alpha_i = \begin{bmatrix} -1.24941667 \\ 1.17945833 \\ 0.06995833 \end{bmatrix}$$

$$\bar{Y}_{.j.} - \bar{Y}_{...} = \beta_j = \begin{bmatrix} -0.3719583 \\ 0.3719583 \end{bmatrix}$$

$$\bar{Y}_{..k} - \bar{Y}_{...} = \gamma_k = \begin{bmatrix} 0.6472083 \\ -0.3907917 \\ -0.1804583 \\ -0.07595833 \end{bmatrix}$$

Per quanto riguarda la devianza di blocchi, lavorazioni e diserbo, basta calcolare il quadrato degli scarti e sommare i valori ottenuti, moltiplicando per il numero di osservazioni che abbiamo per ogni blocco/lavorazione/diserbo.

In questo modo, considerando che, in un blocco, abbiamo 6 osservazioni, la devianza dei blocchi è:

$$SS_b = 6 \times (0.6472083^2 + 0.3907917^2 + 0.1804583^2 + 0.07595833^2) = 3.65959$$

La devianza delle lavorazioni, considerando che, per ognuna, abbiamo 8 valori, è:

$$SS_l = 8 \times (1.24941667^2 + 1.17945833^2 + 0.06995833^2) = 23.65647$$

Per il diserbo:

$$SS_i = 12 \times (0.3719583^2 + 0.3719583^2) = 3.320472$$

Per l'interazione, non possiamo procedere nello stesso modo, in quanto la variabilità esistente tra le medie delle sei combinazioni è il risultato, non solo dell'eventuale interazione, ma anche degli effetti principali. Infatti, se ricordiamo il modello lineare per un disegno a due vie, risulta che il valore atteso per una combinazione è:

$$\bar{Y}_{ij.} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij}$$

Se abbiamo utilizzato il vincolo sulla somma,  $\mu$  è la media generale,  $\alpha_i$  sono gli effetti delle lavorazioni (l'ultima colonna della tabella sovrastante),  $\beta_j$  sono gli effetti dei diserbi (ultima riga della tabella sovrastante). Di conseguenza, gli effetti dell'interazione sono:

$$\alpha\beta_{ij} = \bar{Y}_{ij.} - \bar{Y}_{i..} - \bar{Y}_{.j.} + \bar{Y}_{...}$$

Ora, siccome

$$\alpha_i = \bar{Y}_{i..} - \bar{Y}_{...}$$

e

$$\beta_j = \bar{Y}_{.j.} - \bar{Y}_{...}$$

possiamo scrivere:

$$\alpha\beta_{ij} = \bar{Y}_{ij.} - \bar{Y}_{...} - \bar{Y}_{i..} + \bar{Y}_{...} - \bar{Y}_{.j.} + \bar{Y}_{...} = \bar{Y}_{ij.} - \bar{Y}_{i..} - \bar{Y}_{.j.} + \bar{Y}_{...}$$

Ad esempio:

$$\alpha\beta_{11} = 5.995 - 7.488875 - 8.366333 + 8.738292 = -1.121916$$

Completando i calcoli:

$$\alpha\beta_{ij} = \begin{bmatrix} -1.1219 & 1.1219 \\ 1.0830 & -1.0830 \\ 0.0390 & -0.0390 \end{bmatrix}$$

Elevando al quadrato, sommando e moltiplicando per quattro otteniamo la devianza dell'interazione, pari a:

$$SS_{ld} = 4 \times (1.1219^2 + 1.1219^2 + 1.0830^2 + 1.0830^2 + 0.0390^2 + 0.0390^2) = 19.46456$$

Questi calcoli manuali possono essere utili per meglio comprendere il senso della scomposizione della varianza, ma sono da considerare obsoleti, in quanto, nell'uso comune, nessuno li esegue più senza l'aiuto di un computer.

# Capitolo 12

## La regressione lineare semplice

Nella sperimentazione agronomica e, in genere, biologica, la variabile indipendente (o le variabili indipendenti) può (possono) rappresentare una quantità, come, ad esempio, la dose di un farmaco, il tempo trascorso da un certo evento, la fittezza di semina e così via. In questa condizione, l'analisi dei dati richiede modelli diversi da quelli visti finora, che erano sempre caratterizzati da variabili indipendenti qualitative (modelli ANOVA). Quando la variabile indipendente è quantitativa (regressore) parliamo di modelli di regressione.

Questa classe di modelli è estremamente interessante e si presta a sviluppi potentissimi. In questo libro ci accontenteremo di trattare la regressione lineare semplice, cioè un modello lineare (retta) con una variabile dipendente ed un regressore. Nel capitolo successivo estenderemo le considerazioni fatte alle funzioni non-lineari.

### 12.1 Caso studio: effetto della concimazione azotata al frumento

Per individuare la relazione tra la concimazione azotata e la produzione del frumento, è stato organizzato un esperimento a randomizzazione completa, con quattro dosi di azoto e quattro repliche. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 12.1 e possono essere caricati direttamente da [gitHub](#), con il codice sottostante. A differenza dei capitoli precedenti, in questo caso il dataset

Tabella 12.1: Dataset relativo ad una prova di concimazione azotata su frumento

Dose	1	2	3	4
0	21.98	25.69	27.71	19.14
60	35.07	35.27	32.56	32.63
120	41.59	40.77	41.81	40.50
180	50.06	52.16	54.40	51.72

non è ottenuto da una prova vera, ma è stato generato, con il codice riportato in alla fine del capitolo. Pertanto, l'esempio, pur essendo efficace da un punto di vista didattico, potrebbe non essere assolutamente realistico.

```
path1 <- "https://raw.githubusercontent.com/OnofriAndreaPG/"
path2 <- "agroBioData/master/"
name <- "NWheat.csv"
pathName <- paste(path1, path2, name, sep = "")
dataset <- read.csv(pathName, header=T)
```

## 12.2 Analisi preliminari

Questo esperimento è replicato ed è totalmente analogo a quello presentato nel capitolo 7, con l'unica differenza che, in questo caso, la variabile indipendente è quantitativa. Tuttavia, è del tutto logico considerare la dose di azoto come un predittore qualitativo ('factor') ed utilizzare un modello descrittivo ANOVA ad una via. Eseguiamo il 'fitting' con R, ottenendo i risultati seguenti:

```
model <- lm(Yield ~ factor(Dose), data = dataset)
anova(model)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Yield
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## factor(Dose)  3 1725.96   575.32  112.77 4.668e-09 ***
## Residuals    12   61.22    5.10
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

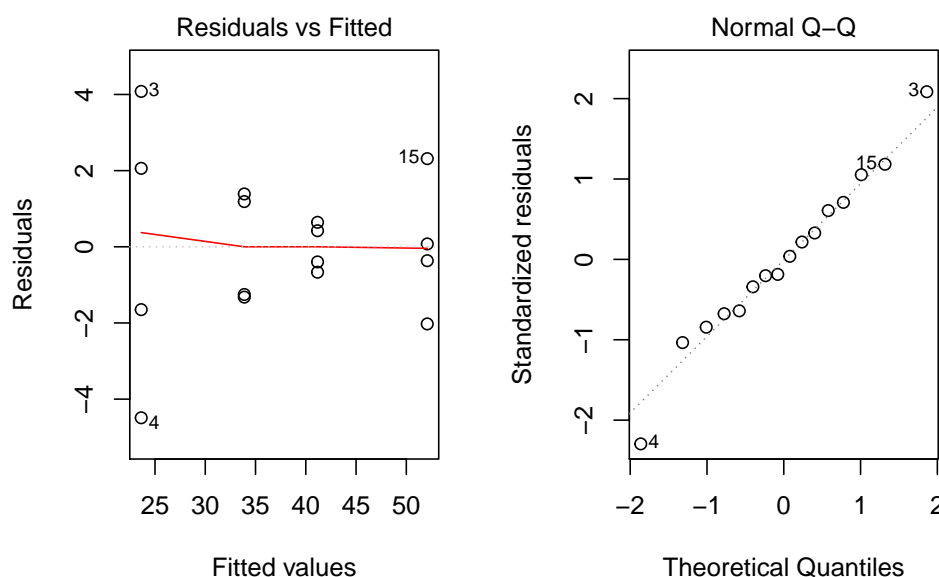


Figura 12.1: Analisi grafica dei residui per una prova di concimazione azotata del frumento

Osserviamo che l'effetto del trattamento è significativo e il SEM è pari a  $\sqrt{5.10/4} = 1.129$ . Prima di proseguire, verifichiamo che non ci siano problemi relativi alle assunzioni parametriche di base e che, quindi, la trasformazione dei dati non sia necessaria. I grafici dei residui, riportati in Figura 12.1, non mostrano patologie rilevanti.

Da questo momento in avanti, diversamente a quanto abbiamo visto nei capitoli precedenti, l'analisi non prosegue con un test di confronto multiplo, che in questa situazione, se non del tutto errato, sarebbe comunque da considerare 'improprio'. Infatti, quale senso avrebbe confrontare la risposta produttiva a 60 kg N ha<sup>-1</sup> con quella a 120 kg N ha<sup>-1</sup>? In realtà noi non siamo specificatamente interessati a queste due dosi, ma a qualunque altra dose nell'intervallo da 0 a 180 kg N ha<sup>-1</sup>. Abbiamo selezionato quattro dosi per organizzare l'esperimento, ma resta il fatto che siamo interessati a definire una funzione di risposta per tutto l'intervallo delle dosi, non a confrontare le risposte a due dosi in particolare.

Per questo motivo, quando la variabile indipendente è una dose, l'analisi dei dati dovrebbe essere basata sull'impiego di un modello di regressione, in quanto ciò è più coerente con le finalità dell'esperimento, rispetto all'adozione di una procedura di confronto multiplo.



### 12.3 Definizione del modello lineare

Immaginiamo che, almeno nell'intervallo di dosi incluso nell'esperimento, l'effetto della concimazione azotata sulla produzione sia lineare. In effetti, l'andamento dei dati conferma questa impressione e, pertanto, poniamo il modello lineare nei termini usuali:

$$Y_i = b_0 + b_1 X_i + \varepsilon_i$$

dove  $Y$  è la produzione della parcella  $i$ , trattata con la dose  $X_i$ ,  $b_0$  è l'intercetta (produzione a dose di azoto pari a 0) e  $b_1$  è la pendenza, cioè l'incremento di produzione per ogni incremento unitario della dose. La componente stocastica  $\varepsilon$  viene assunta omoscedastica e normalmente distribuita, con media 0 e deviazione standard  $\sigma$ .

### 12.4 Stima dei parametri

Dobbiamo a questo punto individuare i parametri  $b_0$  e  $b_1$  in modo tale che la retta ottenuta sia la più vicina ai dati, cioè in modo da minimizzare gli scostamenti tra i valori di produzione osservati e quelli stimati dal modello (soluzione dei minimi quadrati). La funzione dei minimi quadrati è:

$$\begin{aligned} Q &= \sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y})^2 = \sum_{i=1}^N (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2 = \\ &= \sum_{i=1}^N (Y_i^2 + b_0^2 + b_1^2 X_i^2 - 2Y_i b_0 - 2Y_i b_1 X_i + 2b_0 b_1 X_i) = \\ &= \sum_{i=1}^N Y_i^2 + N b_0^2 + b_1^2 \sum_{i=1}^N X_i^2 - 2b_0 \sum_{i=1}^N Y_i - 2b_1 \sum_{i=1}^N X_i Y_i + 2b_0 b_1 \sum_{i=1}^N X_i \end{aligned}$$

Calcolando le derivate parziali rispetto a  $b_0$  e  $b_1$  che, al momento, sono le nostre incognite, ed eguagliandole a 0 si ottengono le seguenti formule risolutive:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^N [(X_i - \mu_X)(Y_i - \mu_Y)]}{\sum_{i=1}^N (X_i - \mu_X)^2}$$

e

$$b_0 = \mu_Y - b_1\mu_X$$

Invece che svolgere i calcoli a mano, possiamo eseguire il fitting ai minimi quadrati con R. Possiamo notare che l'unica differenza tra questo modello di regressione e il modello ANOVA utilizzato poco sopra è che qui utilizziamo la variabile 'Dose' come tale, senza trasformarla in un 'factor'.

```
modelReg <- lm(Yield ~ Dose, data = dataset)
summary(modelReg)
##
## Call:
## lm(formula = Yield ~ Dose, data = dataset)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -4.6537 -1.5350 -0.4637  1.9250  3.9163
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept) 23.793750   0.937906   25.37 4.19e-13 ***
## Dose         0.154417   0.008356   18.48 3.13e-11 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 2.242 on 14 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.9606, Adjusted R-squared:  0.9578
## F-statistic: 341.5 on 1 and 14 DF,  p-value: 3.129e-11
```

Ora sappiamo che la relazione tra la dose di azoto e la risposta produttiva del frumento è:

$$Y_i = 23.111 + 0.170 \times X_i$$

L'elemento stocastico  $\varepsilon_i$  è normalmente distribuito, con media 0 e deviazione standard 2.029 (vedi la voce 'Residual standard error' nell'output sovrastante).

Come al solito, prima di qualunque altra considerazione, dobbiamo verificare la bontà del modello e il rispetto delle assunzioni di base, con una procedura che, per un modello di regressione, deve riguardare un maggior numero di aspetti rispetto ad un modello ANOVA.

## 12.5 Valutazione della bontà del modello

In primo luogo, è necessario verificare il rispetto delle assunzioni di base di normalità e omoscedasticità dei residui. Per questo, possiamo utilizzare gli stessi metodi impiegati per i modelli ANOVA, vale a dire un grafico dei residui verso gli attesi ed un QQ-plot dei residui standardizzati. In realtà, abbiamo già eseguito questo controllo con il modello ANOVA corrispondente e non vi è la necessità di ripeterlo con questo modello.

Dobbiamo invece assicurarci che i dati osservati siano ben descritti dal modello adottato, senza nessuna componente sistematica di mancanza d'adattamento. In altre parole, le osservazioni non debbono contraddire l'ipotesi che la risposta è lineare, salvo per le eventuali deviazioni casuali insite in qualunque esperimento. Per la verifica della **bontà di adattamento** possiamo utilizzare diverse procedure, che illustreremo di seguito.

### 12.5.1 Valutazione grafica

Nel modo più semplice, la bontà di adattamento può essere valutata attraverso un grafico dei valori attesi e dei valori osservati, come quello in Figura 12.2. Notiamo che non c'è alcun elemento che faccia pensare ad una sistematica deviazione rispetto alle previsioni fatte dal modello.

### 12.5.2 Errori standard dei parametri

In secondo luogo, possiamo valutare gli errori standard delle stime dei parametri, che non debbono mai essere superiori alla metà del valore del parametro stimato, cosa che in questo caso è pienamente verificata. Se così non fosse, l'intervallo di confidenza del parametro, usualmente stimato utilizzando il doppio dell'errore standard, conterrebbe lo zero, il che equivarrebbe a dire che, ad esempio, la pendenza 'vera' (cioè quella della popolazione da cui il nostro campione è estratto) potrebbe essere nulla. In altre parole, la retta potrebbe essere 'piatta', dimostrando l'inesistenza di relazione tra la dose di concimazione e la produzione della coltura. In realtà, nell'esempio in studio questo dubbio non sussiste.

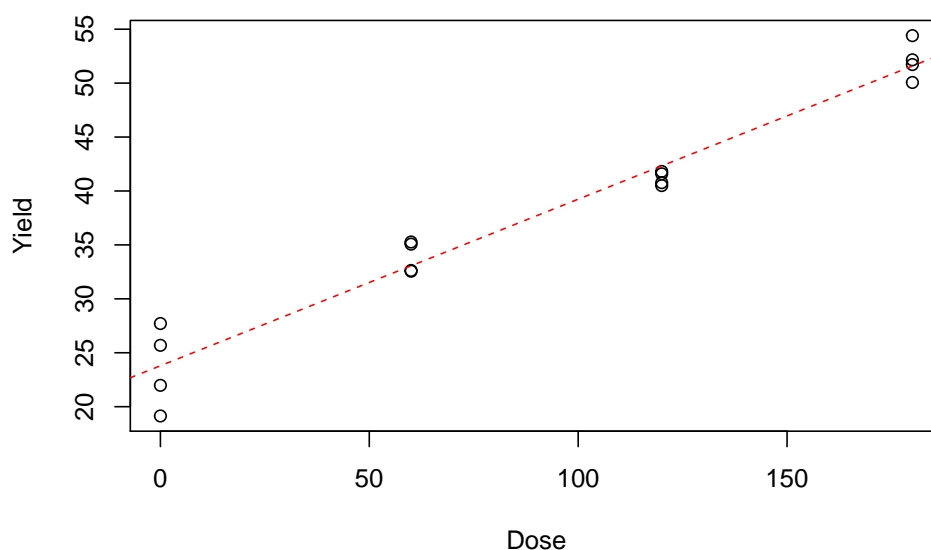


Figura 12.2: Risposta produttiva del frumento alla concimazione azotata: dati osservati (simboli) e valori attesi (linea tratteggiata).

### 12.5.3 Test F per la mancanza d'adattamento

In terzo luogo, possiamo analizzare i residui della regressione, cioè gli scostamenti dei punti rispetto alla retta e, in particolare, la somma dei loro quadrati. Possiamo vedere che questo valore è pari a 70.37, ed è più alto di quello del corrispondente modello ANOVA, impiegato in precedenza (61.22):

```
anova(modelReg)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Yield
##          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## Dose       1 1716.80 1716.80  341.54 3.129e-11 ***
## Residuals 14   70.37    5.03
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Il risultato è perfettamente normale, dato che il residuo del modello ANOVA contiene solo la misura dello scostamento di ogni dato rispetto alla media del suo gruppo, che si può considerare ‘errore puro’, mentre il residuo della regressione, oltre all’errore puro, contiene anche una componente detta ‘mancanza d’adattamento’ (lack of fit), misurabile con lo scostamento di ogni media dalla linea di regressione. In effetti, la regressione lineare è solo

un'approssimazione della reale relazione biologica tra la concimazione e la produzione del frumento.

Insomma, il modello di regressione è un modello che ha sempre minor capacità descrittiva rispetto ad un modello ANOVA. La differenza può essere quantificata utilizzando le devianze dei rispettivi residui:

$$\text{Lack of fit} = 70.37 - 61.22 = 9.15$$

Bisogna però anche dire che il modello di regressione è più parsimonioso, nel senso che ci ha costretto a stimare solo due parametri ( $b_0$  e  $b_1$ ), mentre il modello ANOVA ce ne ha fatti stimare quattro ( $\mu$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ , considerando che  $\alpha_1 = 0$ ). Quindi il residuo del modello di regressione ha 14 gradi di libertà (16 dati meno due parametri stimati), mentre il residuo del modello ANOVA ne ha 12 (16 - 4). La componente di lack of fit ha quindi  $14 - 12 = 2$  gradi di libertà. Ci chiediamo, questa componente di lack of fit è significativamente più grande dell'errore puro?

L'ipotesi nulla di assenza di lack of fit può essere testata con un test di F, per il confronto di due varianze: se questo è significativo allora la componente di mancanza d'adattamento non è trascurabile, ed il modello di regressione dovrebbe essere rifiutato. L'espressione è:

$$F_{lack} = \frac{\frac{RSS_r - RSS_a}{DF_r - DF_a}}{\frac{RSS_a}{DF_a}} = \frac{MS_{lack}}{MSE_a}$$

dove  $RSS_r$  è la devianza residua della regressione con i suoi gradi di libertà  $DF_r$  e  $RSS_a$  è la devianza residua del modello ANOVA, con i suoi gradi di libertà  $DF_a$ . In R, il test F per la mancanza d'adattamento può essere eseguito con la funzione `'anova()'`, confrontando i due modelli alternativi:

```
anova(modelReg, model)
## Analysis of Variance Table
##
## Model 1: Yield ~ Dose
## Model 2: Yield ~ factor(Dose)
##   Res.Df    RSS Df Sum of Sq    F Pr(>F)
## 1      14 70.373
## 2      12 61.219  2    9.1542 0.8972 0.4334
```

Vediamo che non otteniamo risultati significativi ( $P = 0.4334$ ). Ciò supporta l'idea che non vi sia mancanza d'adattamento e quindi la regressione fornisca

una descrizione altrettanto adeguata dei dati sperimentali rispetto al più ‘complesso’ modello ANOVA. Scegliamo quindi il modello di regressione, in quanto più semplice, nel rispetto del principio del rasoio di Occam.

### 12.5.4 Test F per la bontà di adattamento e coefficiente di determinazione

Abbiamo dimostrato che il modello di regressione non è significativamente peggiore del modello ANOVA corrispondente. Un approccio alternativo per dimostrare la bontà di adattamento è verificare se il modello di regressione è significativamente migliore di un modello ‘nullo’. Ricordiamo che con il modello ‘nullo’ ( $Y_i = \mu + \varepsilon_i$ ) si assume che la risposta sia costante e pari alla media di tutti i dati, escludendo così ogni effetto della dose di concimazione. La devianza del residuo di un modello nullo non è altro che la devianza totale dei dati, che risulta pari a 1787.178:

```
modNull <- lm(Yield ~ 1, data = dataset)
deviance(modNull)
## [1] 1787.178
```

Abbiamo visto che la devianza del modello di regressione è pari a 70.37: la differenza (1716.81) rappresenta la ‘bontà di adattamento’, cioè una misura di quanto migliora il potere descrittivo del modello aggiungendo l’effetto ‘dose’. Quindi, un test di F per la bontà di adattamento può essere costruito come:

$$F_{good} = \frac{\frac{RSS_t - RSS_r}{DF_t - DF_r}}{\frac{RSS_r}{DF_r}} = \frac{MS_{good}}{MSE_r}$$

dove  $RSS_t$  è la devianza totale dei dati con i suoi gradi di libertà  $DF_t$ . In R, il test F per la bontà d’adattamento può essere eseguito con la funzione ‘anova()’, senza la necessità di includere come argomento il modello ‘nullo’:

```
anova(modelReg)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Yield
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## Dose       1 1716.80 1716.80   341.54 3.129e-11 ***
## Residuals 14   70.37    5.03
```

```
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Vediamo che in questo caso l'ipotesi nulla deve essere rifiutata: la varianza spiegata dalla regressione è significativamente maggiore di quella del residuo.

Più frequentemente, la devianza spiegata dalla regressione viene rapportata alla devianza totale, per individuare quanta parte della variabilità dei dati è spiegata dal modello prescelto. Questa proporzione definisce il cosiddetto **coefficiente di determinazione** o  $R^2$ :

$$R^2 = \frac{SS_{reg}}{SS_{tot}} = \frac{1716.81}{1787.18} = 0.961$$

Questa statistica varia da 0 ad 1 e la regressione è tanto migliore quanto più essa si avvicina ad 1. In realtà il coefficiente di determinazione è visibile nell'output della funzione 'summary()' applicata all'oggetto 'modelReg' (vedi più sopra).

## 12.6 Previsioni

Dato che il modello ha mostrato di funzionare bene, con prudenza possiamo utilizzarlo per prevedere le produzioni a dosi intermedie, che non sono state incluse in prova. Ovviamente ci si deve mantenere entro il valore massimo e quello minimo inclusi in prova. In R, ciò è possibile utilizzando la funzione 'predict()', passando come argomento le dosi alle quali effettuare la previsione, organizzate in un data frame. Ad esempio, se si vuole prevedere la produzione a 30 e 80 kg N ha<sup>-1</sup>, il codice è:

```
pred <- predict(modelReg, newdata=data.frame(Dose=c(30, 80)), se=T)
pred
## $fit
##      1      2
## 28.42625 36.14708
##
## $se.fit
##      1      2
## 0.7519981 0.5666999
##
## $df
```

```
## [1] 14
##
## $residual.scale
## [1] 2.242025
```

E'anche possibile effettuare la previsione inversa, cioè chiedere ai dati qual è la dose a cui corrisponde una produzione di 45 q/ha. In questo caso dobbiamo tener presente che l'equazione inversa è:

$$X = \frac{Y - b_0}{b_1}$$

Per calcolare il risultato possiamo utilizzare la funzione 'deltaMethod()', nel package 'car', che ci calcola anche gli errori standard con il metodo della propagazione degli errori:

```
car::deltaMethod(modelReg, "(45 - b0)/b1",
                  parameterNames=c("b0", "b1"))
##              Estimate      SE    2.5 % 97.5 %
## (45 - b0)/b1 137.3314    4.4424 128.6244 146.04
```

Il procedimento sopra descritto è molto comune, per esempio nei laboratori chimici, dove viene utilizzato nella fase di calibrazione di uno strumento. Una volta che la retta di calibrazione è stata individuata, essa viene utilizzata per determinare le concentrazioni incognite di campioni per i quali sia stata misurata la risposta.

---

## 12.7 Per approfondire un po'...

1. Draper, N.R., Smith, H., 1981. Applied Regression Analysis, in: Applied Regression. John Wiley & Sons, Inc., IDA, pp. 224–241.
2. Faraway, J.J., 2002. Practical regression and Anova using R. <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Faraway-PRA.pdf>, R.



## Capitolo 13

# La regressione non-lineare

I fenomeni biologici, come ad esempio la crescita di una coltura, la cinetica degradativa degli erbicidi nel terreno, la risposta produttiva delle colture a densità crescenti di malerbe o a dosi crescenti di concime, la risposta fitotossica di una specie infestante alla dose di un erbicida, hanno in genere andamenti curvilinei, posseggono punti di massimo o minimo, flessi e, soprattutto, hanno frequentemente asintoti. Pertanto, difficilmente possono essere descritti con funzioni lineari, a meno che non ci accontentiamo di approssimare localmente l'andamento dei dati, in un intervallo ristretto della variabile indipendente.

Da un punto di vista pratico, è quindi fondamentale saper adattare ai dati funzioni curvilinee di ogni tipo. Introduciamo il problema con un esempio.

### 13.1 Caso studio: degradazione di un erbicida nel terreno

Un suolo è stato trattato con metamitron (un erbicida) alla concentrazione di  $100 \text{ ng g}^{-1}$ . Dopo essere stato opportunamente mescolato, è stato distribuito in 24 contenitori di alluminio e posto in cella climatica alla temperatura di  $20^\circ\text{C}$ . In 8 tempi diversi dopo l'inizio del saggio, sono stati prelevati 3 contenitori e sottoposti ad analisi chimica per la determinazione della concentrazione residua dell'erbicida. I dati osservati sono disponibili nel package 'aomisc', che deve quindi essere installato e caricato in memoria, secondo le istruzioni fornite nell'introduzione.

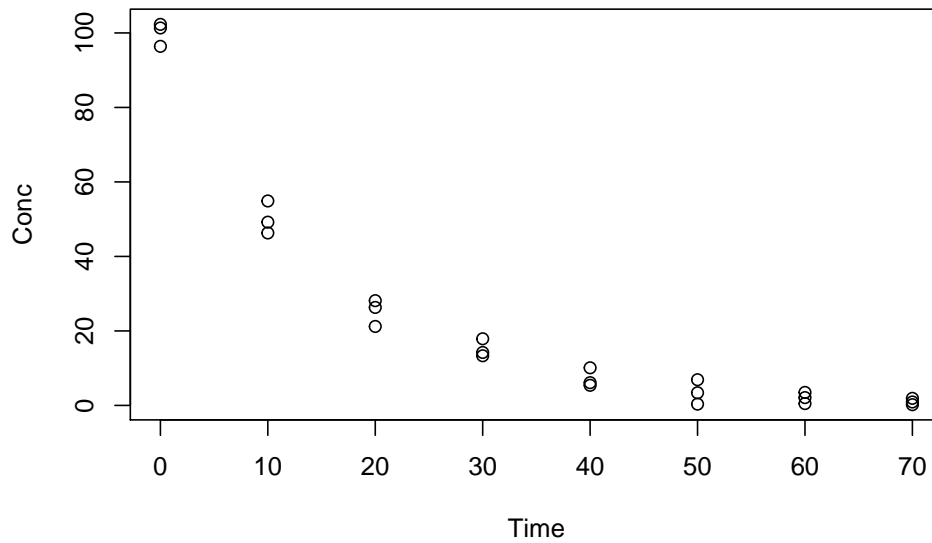


Figura 13.1: Degradazione di metamitron nel terreno

```
library(aomisc)
data(degradation)
head(degradation, 10)
##      Time  Conc
## 1      0  96.40
## 2     10  46.30
## 3     20  21.20
## 4     30  17.89
## 5     40  10.10
## 6     50   6.90
## 7     60   3.50
## 8     70   1.90
## 9      0 102.30
## 10    10  49.20
```

Per prima cosa, plottiamo i dati osservati (Figura 13.1); vediamo che l'andamento della concentrazione nel tempo è chiaramente curvilineo e, di conseguenza, non possiamo utilizzare la regressione lineare semplice, esposta nel capitolo precedente.

In realtà, possiamo ancora utilizzare la stessa equazione generale che abbiamo introdotto nel capitolo 4, cioè:

$$Y_i = f(X_i, \theta) + \varepsilon_i$$

In questa funzione,  $X$  è il tempo,  $Y$  la concentrazione,  $\theta$  sono i parametri del modello (da stimare) ed  $\varepsilon$  sono i residui, che si assumono omoscedastici e normalmente distribuiti. La differenza sta nel fatto che  $f$  è non lineare.

## 13.2 Scelta della funzione

Uno dei criteri fondamentali, seppur empirico, per la selezione di una funzione non-lineare è quello di considerarne la forma, in relazione al fenomeno biologico in studio. Per questo scopo, le equazioni sono spesso classificate in base alla forma, come:

1. Lineari (es. retta)
2. Convesse/concave (es. funzione esponenziale, funzione di potenza, funzione logaritmica, iperbole)
3. Sigmoidali (es. funzione logistica, funzione di Gompertz)
4. Curve con massimi/minimi (equazione di Brain-Cousens, equazione di Braggs)

La descrizione di queste equazioni esula dallo scopo di questo libro, anche se il loro studio può essere di notevole interesse, anche per un biologo o un agronomo. Infatti, riuscire a tradurre nel linguaggio matematico un fenomeno biologico è forse uno degli obiettivi più affascinanti che un ricercatore si possa porre. Per chi fosse interessato, riportiamo in calce al capitolo alcuni interessanti riferimenti.

Noi ci poniamo nella situazione più comune, quella in cui la scelta del modello viene fatta in base all'esperienza o alle informazioni disponibili in letteratura. In questo caso, le conoscenze relative alla cinetica di degradazione dei composti chimici ci suggeriscono un'equazione di decadimento esponenziale (cinetica del primo ordine), così definita:

$$Y_i = Ae^{-kX_i} + \varepsilon_i$$

dove  $A$  è la concentrazione iniziale e  $k$  è il tasso di degradazione (costante nel tempo). Come anticipato, la componente stocastica  $\varepsilon$  si assume normalmente distribuita e omoscedastica.

## 13.3 Stima dei parametri

Dopo aver definito  $f$ , dobbiamo stimare i parametri  $A$  e  $k$ . In generale esistono tre tecniche fondamentali:

1. linearizzazione della funzione tramite trasformazione delle variabili;
2. approssimazione della vera funzione curvilinea con una polinomiale in  $X$ ;
3. adattamento ai dati sperimentali di funzioni curvilinee, tramite metodiche di regressione non-lineare.

### 13.3.1 Linearizzazione della funzione

Nel caso specifico, prendendo il logaritmo di entrambe le parti dell'equazione esponenziale, otteniamo la seguente equazione:

$$\log(Y) = \log(A) - k X$$

Quindi, se trasformiamo la  $Y$  (Concentrazione) nel suo logaritmo, possiamo utilizzare un modello di regressione lineare semplice per la stima dei parametri. Ovviamente, otterremo, come intercetta, il logaritmo della concentrazione iniziale e, come pendenza, otterremo un valore negativo per  $k$ , in quanto la retta è decrescente.

```
mod <- lm(log(Conc) ~ Time, data=degradation)
summary(mod)
##
## Call:
## lm(formula = log(Conc) ~ Time, data = degradation)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.11738 -0.09583  0.05336  0.31166  1.01243
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  4.662874   0.257325   18.12 1.04e-14 ***
## Time        -0.071906   0.006151  -11.69 6.56e-11 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
```

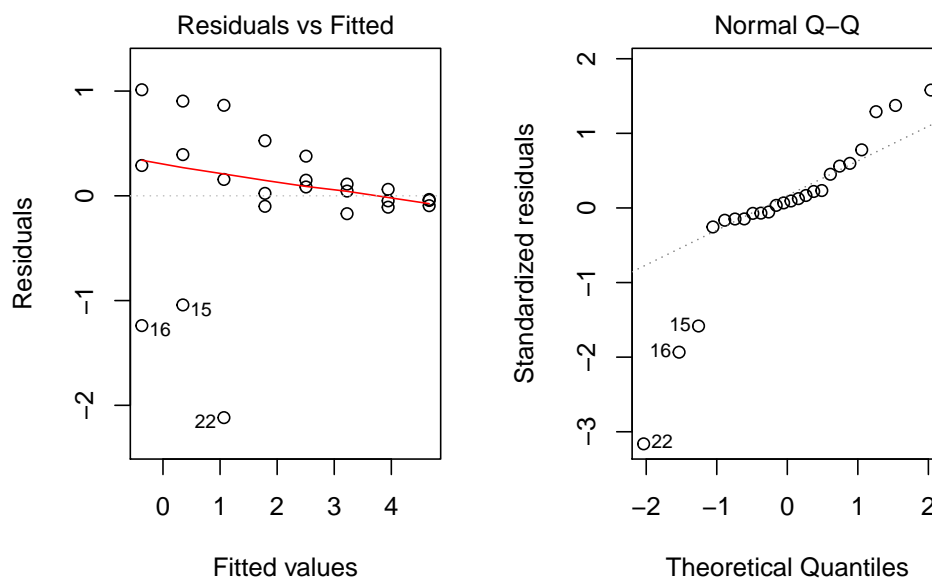


Figura 13.2: Linearizzazione di una funzione esponenziale.

```
## Residual standard error: 0.6905 on 22 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.8613, Adjusted R-squared:  0.855
## F-statistic: 136.6 on 1 and 22 DF,  p-value: 6.564e-11
```

Le funzioni non-lineari che possono essere trasformate in lineari sono dette *linearizzabili* e hanno il vantaggio di semplificare molto i calcoli richiesti per la stima dei parametri. Un grave svantaggio è dato dal fatto che, trasformando la  $Y$ , si trasforma anche la distribuzione degli errori e quindi bisogna verificare che le assunzioni di base dei modelli lineari (omogeneità delle varianze e normalità dei residui) siano valide nella scala trasformata.

```
par(mfrow = c(1,2))
plot(mod, which = 1)
plot(mod, which = 2)
```

Il grafico dei residui (Figura 13.2 ) suggerisce che questi sono inversamente proporzionali ai valori attesi (più alto il logaritmo della concentrazione più bassi i residui). Questo fa sospettare che le varianze potrebbero essere omogenee sulla scala originale, impedendoci quindi di analizzare i dati nella scala trasformata.

Per completezza, dobbiamo comunque dire che, qualora le assunzioni di base fossero rispettate nella scala trasformata, il metodo della linearizzazione rappresenterebbe una tecnica corretta ed affidabile per l'analisi dei dati.

### 13.3.2 Approssimazione della vera funzione tramite una polinomiale in X

Molte andamenti non-lineari possono essere approssimati tramite funzioni polinomiali di ordine  $n$ . Le funzioni polinomiali sono molto flessibili; contengono la funzione lineare come caso particolare ( $n = 1$ ) e permettono di descrivere curvature anche molto complesse, semplicemente aumentando l'ordine della funzione. In questo modo, è possibile ottenere un adattamento ai dati sperimentali teoricamente anche perfetto.

Le funzioni polinomiali sono un tipico esempio di funzioni curvilinee, ma lineari nei parametri; esse possono essere trattate ricorrendo alle metodiche di calcolo normalmente utilizzate per la regressione lineare.

Gli svantaggi delle funzioni polinomiali sono relativi al fatto che queste presentano raramente giustificazione biologica. Per esempio, con le funzioni polinomiali non è possibile descrivere relazioni asintotiche, che sono invece molto comuni in biologia. Nel nostro esempio si potrebbe utilizzare una funzione polinomiale di II grado (parabola), che, con il suo braccio decrescente, potrebbe descrivere la degradazione di un erbicida in modo sufficientemente buono.

Eseguiamo il fitting con R, utilizzando l'usuale funzione 'lm()'. Successivamente, utilizziamo la funzione 'predict()' per generare valori attesi per una sequenza temporale da 0 a 70 giorni e plottarli.

```
mod2 <- lm(Conc ~ Time + I(Time^2), data=degradation)
pred <- predict(mod2, newdata = data.frame(Time = seq(0, 70, by = 0.1)))
plot(Conc ~ Time, data=degradation)
lines(pred ~ seq(0, 70, by = 0.1), col = "red")
```

Vediamo come la funzione inserita, mentre approssima abbastanza bene i dati nell'intervallo da 0 a 40 giorni, successivamente mostra una ricrescita, che non ha alcun senso biologico (Figura 13.3 ).

In generale, le polinomiali sono utilizzate quando non si hanno conoscenze 'a priori' sul fenomeno in studio e sia necessario approssimarlo con una funzione curvilinea, in un intervallo della X molto ristretto, senza la necessità di estrapolare previsioni al di fuori di questo intervallo. Per questi motivi, il campo d'impiego delle funzioni polinomiale è abbastanza ristretto.

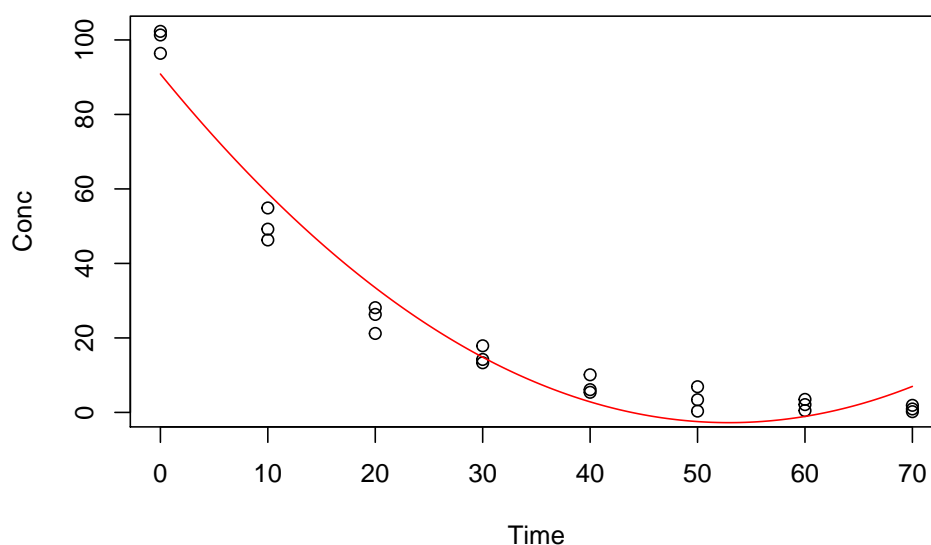


Figura 13.3: Approssimazione della cinetica di degradazione con una funzione polinomiale (parabola)

### 13.3.3 Minimi quadrati non-lineari

La terza strada, quella più percorsa, è utilizzare metodiche di regressione non-lineare, basate su algoritmi numerici di ricerca delle stime dei minimi quadrati, come il metodo di Gauss-Newton. Nel principio, questo metodo funziona partendo da stime iniziali approssimate dei parametri, che vengono corrette in ogni iterazione successiva fino ad ottenere la convergenza sui valori che minimizzano lo scostamento tra i valori osservati e quelli previsti dalla funzione. Ovviamente, trattandosi di metodi iterativi, le stime ottenute sono solo un'approssimazione dei valori reali, ma più che accettabile per le nostre finalità.

## 13.4 La regressione non-lineare con R

La funzione più comune in R per la parametrizzazione di funzioni non-lineari è `'nls()'`. Nella chiamata alla funzione dobbiamo anche fornire stime iniziali per i valori dei parametri. Ottenere queste stime è facile pensando al loro significato biologico:  $A$  è la concentrazione iniziale e quindi una stima ragionevole è data dal valor medio osservato al tempo 0 (100). Il parametro  $k$  è invece il tasso di degradazione relativo; possiamo notare che nei primi 10 giorni la concentrazione si riduce della metà circa, cioè si abbassa media-

mente un po' più del 5% al giorno. Possiamo quindi assegnare a  $k$  un valore iniziale pari a 0.05.

```
modNlin <- nls(Conc ~ A*exp(-k*Time),
               start=list(A=100, k=0.05),
               data=degradation)
summary(modNlin)
##
## Formula: Conc ~ A * exp(-k * Time)
##
## Parameters:
##      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## A 99.634902    1.461047   68.19  <2e-16 ***
## k  0.067039    0.001887   35.53  <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 2.621 on 22 degrees of freedom
##
## Number of iterations to convergence: 5
## Achieved convergence tolerance: 4.33e-07
```

## 13.5 Verifica della bontà del modello

Le assunzioni parametriche di base relative ai modelli non-lineari sono le stesse dei modelli lineari e, di conseguenza, gli strumenti diagnostici sono analoghi. Bisogna tuttavia menzionare il fatto che, dato l'impiego di metodi iterativi per la ricerca dei valori dei parametri, tutti i risultati a cui si perviene (stima dei parametri, della varianza residua e numero dei gradi di libertà relativi) sono solo una approssimazione di quelli reali. Per questo motivo, nel caso non-lineare i metodi grafici (analisi dei residui) sono largamente preferiti.

### 13.5.1 Analisi grafica dei residui

L'analisi grafica dei residui viene eseguita in modo del tutto analogo a quanto visto per la regressione lineare. In primo luogo, verifichiamo le assunzioni di base di normalità e omoscedasticità, mediante il metodo 'plot()' per l'oggetto 'nls', che è disponibile nel package 'aomisc', già caricato in precedenza.



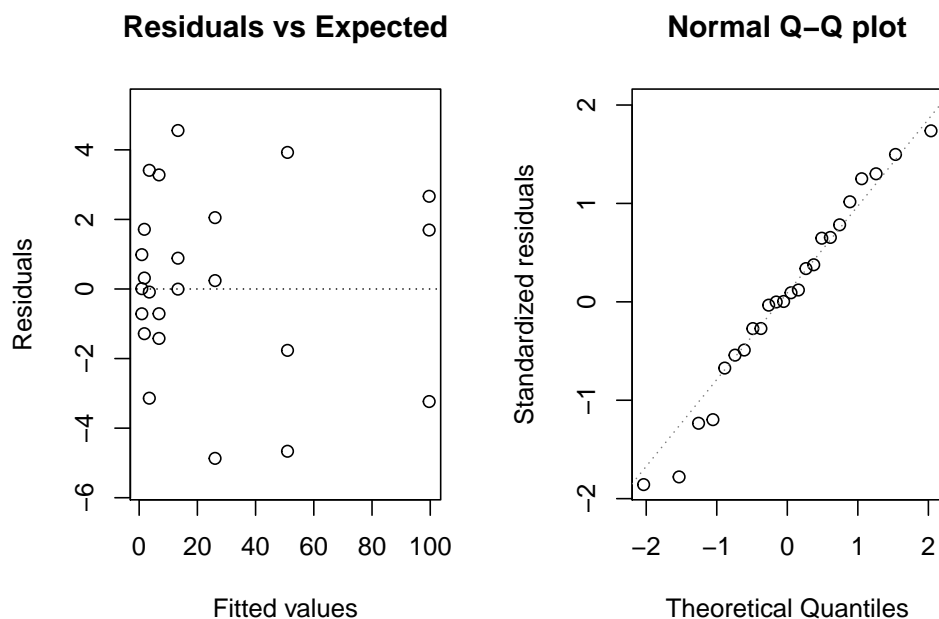


Figura 13.4: Analisi grafica dei residui per la regressione non-lineare, relativa alla degradazione di metamitron nel suolo

```
par(mfrow=c(1,2))
plot(modNlin, which = 1)
plot(modNlin, which = 2)
```

La Figura 13.4 non mostra deviazioni rispetto agli assunti di base. Pertanto, proseguiamo l'analisi grafica della bontà di adattamento, verificando il plot dei valori attesi e di quelli osservati (Figure 13.5). Questo grafico, per gli oggetti 'nls' può essere ottenuto velocemente utilizzando la funzione 'plotnls()', nel package 'aomisc'.

```
library(lattice)
plotnls(modNlin)
```

### 13.5.2 Test F per la mancanza di adattamento (approssimato)

Se abbiamo le repliche (come nellesempio in studio) possiamo effettuare il fitting di un modello ANOVA. Come abbiamo detto nel capitolo precedente, nel modello ANOVA i valori attesi sono costituiti dalle medie dei trattamenti (tempi e livelli di densità, rispettivamente per i due esempi) e lo scostamento di ogni dato rispetto alla 'sua' media è evidentemente dovuto solo all'errore

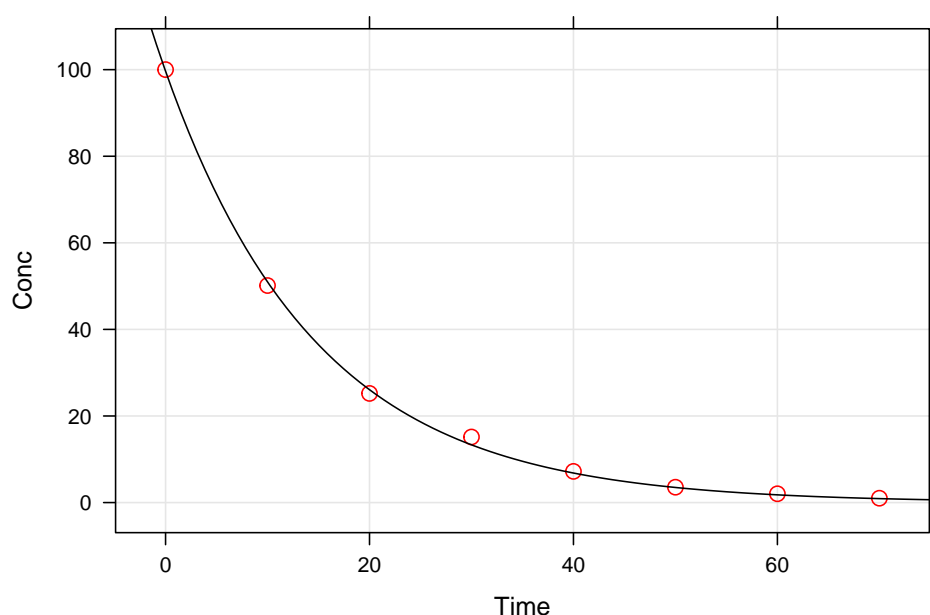


Figura 13.5: Cinetica di degradazione di metamitron nel suolo: i punti mostrano i valori osservati, la linea mostra i valori attesi con l'equazione esponenziale.

sperimentale 'puro'. Nel modello di regressione, invece, esiste una componente aggiuntiva di errore, cioè lo scostamento di ogni media dalla curva di regressione. Questa componente si chiama mancanza d'adattamento e può essere stimata per differenza.

```
modAov <- lm(Conc ~ factor(Time), data=degradation)
anova(modAov)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Conc
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## factor(Time)  7 24698.4   3528.3   415.29 < 2.2e-16 ***
## Residuals    16   135.9     8.5
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
SSa <- anova(modAov)[2,2]
SSa
## [1] 135.9387
```

Inseriamo il tempo come fattore (quindi variabile qualitativa, non quantitativa) e notiamo che la devianza del residuo è pari a 135.9. La varianza del

residuo del modello di regressione si ottiene facendo la somma dei quadrati degli scarti dei dati rispetto ai valori attesi.

```
SSr <- sum(residuals(modNlin)^2)
SSr
## [1] 151.1766
```

Come ci aspettavamo, il modello di regressione ha una devianza più alta, in quanto questa contiene la componente di mancanza d'adattamento, pari alla differenza tra SSa e SSr, cioè:

```
SSl <- SSr - SSa
SSl
## [1] 15.23792
```

Mentre la devianza del residuo dell'ANOVA ha 16 gradi di libertà (24 dati meno 8 parametri stimati), quella del residuo della regression ha 22 gradi di libertà (24 dati meno 2 parametri stimati). La devianza del 'lack of fit' ha quindi  $22 - 16 = 6$  gradi di libertà. La varianza del lack of fit è quindi pari a:

```
SSl/6
## [1] 2.539654
```

Possiamo quindi confrontare formalmente, con un test di F, le due varianze dell'errore puro (dall'ANOVA: 8.5) e quella della mancanza di adattamento, per vedere se quest'ultima è significativamente più 'grande' di quella dell'errore puro. L'ipotesi nulla è che la mancanza d'adattamento non è rilevante ed il test di F è:

```
(Fvalue <- (SSl/6) / anova(modAov)[2,3]) #F value
## [1] 0.2989175
pf(0.2989, 6, 16, lower.tail=F)
## [1] 0.928442
```

Chiaramente il test è non significativo. A questo risultato si arriva facilmente utilizzando la funzione 'anova()' e passandole i due modelli da confrontare anche se uno dei due è un modello di regressione non-lineare.

```
anova(modNlin, modAov)
## Analysis of Variance Table
##
## Model 1: Conc ~ A * exp(-k * Time)
## Model 2: Conc ~ factor(Time)
##   Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)
```

```
## 1      22      151.18
## 2      16      135.94   6 15.238  0.2989 0.9284
```

### 13.5.3 Errori standard dei parametri

Un'altra valutazione importante da fare è quella relativa agli errori standard delle stime dei parametri, che non debbono mai essere superiori alla metà del valore del parametro stimato, cosa che in questo caso è pienamente verificata. Abbiamo già spiegato come, se l'intervallo di confidenza del parametro contiene lo zero, evidentemente quel parametro potrebbe essere rimosso dal modello senza che il fitting peggiori significativamente. Nel nostro esempio, se il tasso di degradazione fosse stato non significativamente diverso da zero, avremmo avuto un'indicazione per sostenere che l'erbicida, di fatto, non mostra degradazione nel tempo.

### 13.5.4 Coefficienti di determinazione

Abbiamo visto che il residuo della regressione è pari a 151.2 con 16 gradi di libertà. La devianza totale dei dati (somma dei quadrati degli scarti rispetto alla media generale) è invece:

```
SSt <- deviance(lm(Conc ~ 1, data=degradation))
```

ed ha 23 gradi di libertà. La differenza:

```
SSt - SSr
## [1] 24683.13
```

costituisce la devianza spiegata dalla regressione. Il coefficiente di determinazione  $R^2$  è quindi:

$$R^2 = \frac{SSt - SSr}{SSt} = \frac{24683.13}{24834.3} = 0.994$$

Il valore ottenuto attesta un ottimo adattamento, in quanto è vicino ad 1. Bisogna ricordare che, pur essendo utilizzato in modo pressoché ubiquitario, il coefficiente di determinazione per i modelli non-lineari fornisce solo un'indicazione abbastanza grezza sulla bontà del modello, in quanto può rimanere alto anche quando vi sono sistematiche violazioni rispetto alla forma della funzione.

Oltre al coefficiente di determinazione tradizionale, può essere utilizzato anche il coefficiente di determinazione corretto, dato dalla proporzione di varianza (MS) spiegata dalla regressione:

$$R_a^2 = 1 - \frac{MS_{residuo}}{MS_{tot}} = 0.9936$$

L' $R^2$  corretto è sempre più basso dell' $R^2$  e tende a penalizzare i modelli con molti parametri. Di conseguenza, favorisce i modelli semplici, nel rispetto del principio del rasoio di Occam.

I due coefficienti di determinazione (tradizionale e corretto) possono essere ottenuti con la funzione 'R2nls()', disponibile nel package 'aomisc'.

```
R2nls(modNlin)
## $R2
## [1] 0.9939126
##
## $R2adj
## [1] 0.9936359
```

## 13.6 Funzioni lineari e nonlineari dei parametri

Gli studi di degradazione, in genere, richiedono la determinazione della semivita. E' facile vedere che questa può essere ricavata dalla funzione di degradazione in questo modo:

$$\frac{A}{2} = A \exp(-k t_{1/2})$$

da cui:

$$t_{1/2} = -\frac{\log\left(\frac{1}{2}\right)}{k}$$

Vediamo insomma che la semivita  $t_{1/2}$  è una funzione non-lineare di  $k$  e può essere ricavata facilmente come:

```
-log(1/2) / coef(modNlin)[2]
##          k
## 10.33945
```

Si pone ora il problema di ricavare l'errore standard di questa stima e/o i suoi intervalli di confidenza. La legge di propagazione degli errori ci insegna a calcolare gli errori standard per le combinazioni lineari dei parametri e ne abbiamo parlato nel capitolo 9. Per le combinazioni non-lineari, come quella che abbiamo utilizzato per calcolare la semivita, esiste un'estensione chiamata 'metodo delta'. Non ne parleremo in dettaglio, in quanto si tratta di un argomento che richiede alcune conoscenze di analisi matematica; tuttavia, mostreremo un esempio del codice R da utilizzare per applicarlo.

In particolare, possiamo utilizzare la funzione `deltaMethod()` del package 'car'. Per evitare problemi, consiglio di estrarre le stime dei parametri dall'oggetto 'nls' ed assegnare a queste nomi corrispondenti a quelli utilizzati nella definizione della funzione di trasformazione, che deve essere fornita come stringa.

```
library(car)
coefs <- coef(modNlin)
names(coefs) <- c("A", "k")
strFun <- "-log(0.5)/k"
deltaMethod(object=coefs, g=strFun, vcov.=vcov(modNlin))
##          Estimate      SE    2.5 % 97.5 %
## -log(0.5)/k 10.33945 0.29102  9.76907 10.91
```

## 13.7 Previsioni

In taluni casi, abbastanza frequenti per la verità, l'analisi di regressione viene eseguita per stimare o predire il valore della  $Y$  corrispondente ad una data  $X$  (calibrazione), oppure della  $X$  corrispondente ad un dato  $Y$  (esempio: determinazione delle dosi efficaci). Normalmente il problema si riduce alla definizione di un'equazione predittiva; nel caso della calibrazione essa coincide con l'equazione originale, nell'altro caso con la sua inversa. Utilizzando queste equazioni è possibile ottenere il valore cercato e il suo errore standard, tramite il metodo delta.

Analogamente alla regressione lineare, per la calibrazione possiamo utilizzare il metodo 'predict()'; ad esempio, per calcolare la concentrazione dell'erbicida ai tempi 10, 15 e 20 giorni utilizziamo il codice sottostante, ricordando che i valori del tempo debbono essere forniti sotto forma di data frame, con una

sola colonna, dal nome corrispondente a quello del regressore nel dataset originale

```
predict(modNlin, newdata=data.frame(Time=c(10, 15, 20)) )
## [1] 50.96413 36.44947 26.06860
```

Come abbiamo visto, l'output non fornisce gli errori standard di queste stime. Tuttavia, dato che la calibrazione non è altro che una combinazione dei parametri del modello, possiamo ottenere lo stesso risultato utilizzando il metodo delta.

```
strFun <- "A*exp(-k*10)"
deltaMethod(object=coefs, g=strFun, vcov.=vcov(modNlin))
##              Estimate      SE    2.5 % 97.5 %
## A * exp(-k * 10) 50.96413  0.91006 49.18044 52.748
strFun <- "A*exp(-k*15)"
deltaMethod(object=coefs, g=strFun, vcov.=vcov(modNlin))
##              Estimate      SE    2.5 % 97.5 %
## A * exp(-k * 15) 36.44947  0.92053 34.64526 38.254
strFun <- "A*exp(-k*20)"
deltaMethod(object=coefs, g=strFun, vcov.=vcov(modNlin))
##              Estimate      SE    2.5 % 97.5 %
## A * exp(-k * 20) 26.06860  0.87816 24.34744 27.79
```

La funzione inversa è:

$$X = -\frac{\log\left(\frac{Y}{A}\right)}{k}$$

Per calcolare il tempo necessario a raggiungere una certa concentrazione (es. 10 mg/g), possiamo ancora utilizzare il metodo delta.

```
strFun <- "-(log(10/A)/k)"
deltaMethod(object=coefs, g=strFun, vcov.=vcov(modNlin))
##              Estimate      SE    2.5 % 97.5 %
## -(log(10/A)/k) 34.29237  0.88714 32.55360 36.031
```

## 13.8 Gestione delle situazioni ‘patologiche’

In alcuni casi la verifica della bontà del modello mette in luce situazioni patologiche. In particolare, potrebbe capitare che il modello non sia adatto ai dati, o, al contrario, che i dati non siano adatti al modello. Nel primo caso è necessario trasformare il modello, mentre nel secondo caso l'azione più

comune è quella di trasformare i dati. Vediamo queste due operazioni un po' più nel dettaglio.

### 13.8.1 Trasformazione del modello

A volte può capitare che il modello non si adatti ai dati. Ad esempio, perché la cinetica degradativa non è del primo ordine ma è lineare, oppure più concava di quello che il modello esponenziale riesca a prevedere. In una situazione del genere, la cosa migliore è cambiare equazione, utilizzandone una che mostri un miglior adattamento ai dati sperimentali.

### 13.8.2 Trasformazione dei dati

Se non è il modello ad essere mal definito, ma sono invece i dati a non conformarsi alle assunzioni di base della regressione, è necessario valutare l'esigenza di una trasformazione stabilizzante.

Nelle regressioni non-lineari, come in quelle lineari, è possibile utilizzare la trasformazione di Box e Cox, facendo attenzione, però, al fatto che la sola trasformazione della variabile dipendente comporta anche la modifica della scala sulla quale vengono stimati i parametri, che quindi non conservano il loro valore biologico. Ad esempio, nel modello esponenziale, il parametro  $A$  rappresenta la concentrazione iniziale e, se i dati vengono trasformati in logaritmo, l'unità di misura di  $A$  risulta anch'essa trasformata nella nuova scala logaritmica.

Per questo motivo, dato che le regressioni non-lineari vengono spesso eseguite perché si è interessati alle stime dei parametri nella loro unità di misura originale, si preferisce adottare la cosiddetta tecnica della “trasformazione di entrambe le parti”, o metodo TBS (“Transform Both Sides”). Con questo metodo, vengono trasformati sia i dati osservati per la variabile dipendente, sia il modello:

$$Y^\lambda = f(X)^\lambda$$

Con questa tecnica, le stime dei parametri sono nella loro scala originale, come se la trasformazione non fosse stata eseguita per niente.

Con un oggetto ‘nls’, possiamo utilizzare la funzione ‘boxcox’ nel package ‘aomisc’, che trova il valore ottimale di  $\lambda$  ed esegue la trasformazione. La



funzione 'bcGetLambda()' restituisce il valore utilizzato per la trasformazione.

```
modNlin2 <- boxcox(modNlin)
bcGetLambda(modNlin2)
##
## Estimated lambda: 0.8
## Confidence interval for lambda: [0.56,0.96]
summary(modNlin2)
##
## Formula: bcFct1(Conc) ~ bcFct2(A * exp(-k * Time))
##
## Parameters:
##   Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## A 99.418732   2.091374   47.54  <2e-16 ***
## k  0.066654   0.002042   32.65  <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 1.536 on 22 degrees of freedom
##
## Number of iterations to convergence: 2
## Achieved convergence tolerance: 7.511e-06
```

Invece che far scegliere all funzione 'boxcox' il valore di  $\lambda$  ottimale, possiamo imporlo noi, con l'argomento 'lambda'.

```
modNlin3 <- boxcox(modNlin, lambda = 0.5)
bcGetLambda(modNlin3)
##
## Estimated lambda: 0.5
## Confidence interval for lambda: [NA,NA]
summary(modNlin3)
##
## Formula: bcFct1(Conc) ~ bcFct2(A * exp(-k * Time))
##
## Parameters:
##   Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## A 99.532761   4.625343   21.52 2.87e-16 ***
## k  0.067068   0.002749   24.40 < 2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 0.9196 on 22 degrees of freedom
```

```
##  
## Number of iterations to convergence: 1  
## Achieved convergence tolerance: 7.541e-06
```

Gli outputs mostrano che, nonostante la trasformazione, i parametri hanno conservato la loro scala originale e, di conseguenza, il loro significato biologico.

---

## 13.9 Per approfondire un po'...

### 13.9.1 Riparametrizzazione delle funzioni non-lineari

In alcuni casi abbiamo a disposizione modelli matematici che non sono immediatamente utili per la regressione non-lineare, in quanto non si adattano alla tipologia di dati in nostro possesso o non sono adeguati alle nostre finalità. Per questo motivo, essi debbono essere opportunamente riparametrizzati, cioè posti in una differente forma algebrica. Illustriamo meglio questo aspetto con un esempio, relativo ad un esperimento nel quale è stata valutata la produzione del girasole a densità crescenti di piante infestanti, da 0 a 100 piante per metro quadrato. I risultati ottenuti sono riportati nel dataset 'competition', che è disponibile nel package 'aomisc'. L'esperimento è stato organizzato a randomizzazione completa.

```
library(aomisc)  
data(competition)  
head(competition)  
##   Dens   Yield  
## 1    0 29.58587  
## 2   10 20.16776  
## 3   20 17.82846  
## 4   30  9.02289  
## 5   40 13.41521  
## 6   50 12.80159
```

Secondo la letteratura, la relazione tra perdite produttive e densità delle piante infestanti può essere descritta con una funzione iperbolica di questo tipo (Cousens, 1985):

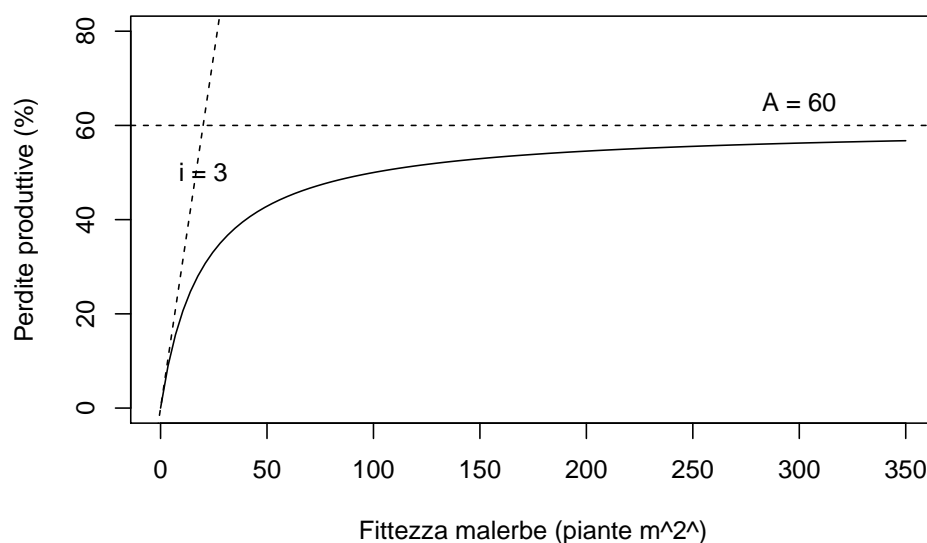


Figura 13.6: Relazione iperbolica tra fittezza delle piante infestanti e perdite produttive. È visualizzata la pendenza iniziale ( $i$ ) e la perdita produttiva massima asintotica ( $A$ ).

$$YL = \frac{iD}{1 + \frac{iD}{A}}$$

Dove  $YL$  sta per perdite produttive (Yield Loss) percentuali,  $D$  è la densità delle piante infestanti,  $i$  è la pendenza nel punto iniziale ( $D = 0$ ) ed  $A$  è la perdita produttiva percentuale massima asintotica. Il grafico è mostrato qui sotto.

Normalmente, in campo non vengono determinate le perdite produttive, bensì le produzioni, come nel caso dell'esperimento relativo al dataset d'esempio. Di conseguenza, il modello iperbolico presentato più sopra non è adatto ai nostri dati, in quanto rappresenta una funzione crescente, mentre i nostri dati mostrano una variabile dipendente (produzione) che decresce al crescere della variabile indipendente (fittezza delle piante infestanti). Pertanto, abbiamo due possibilità:

1. modificare il dataset, esprimendo i dati in termini di perdite produttive percentuali;
2. modificare il modello, per utilizzare la produzione come variabile dipendente, al posto della perdita produttiva.

La prima strada è più agevole, ma ha un problema importante. Infatti, per calcolare la perdita produttiva percentuale nella parcella  $i$ , possiamo utilizzare la seguente equazione:

$$YL_i = \frac{YWF - Y_i}{YWF} \times 100$$

dove  $YWF$  è la produzione nel testimone non infestato e  $Y_i$  è la produzione nella parcella  $i$ . Trattandosi di una prova replicata, abbiamo quattro valori di produzione corrispondenti a  $YWF$ ; quale usiamo? La scelta più logica è quella di utilizzare il valore medio, cioè;

```
YWF <- mean(competition$Yield[competition$Dens==0])
YWF
## [1] 30.42637
```

Operando la trasformazione otteniamo una nuova variabile ( $YL$ ), che possiamo sottoporre a regressione non-lineare, con il modello iperbolico precedentemente indicato. Per ottenere i valori iniziali, possiamo considerare che, con 10 piante per metro quadrato, la perdita produttiva è del 30-35%. Quindi si può immaginare che la prima pianta infestante aggiunta possa (quella che fa più danni) possa causare perdite produttive del 6-7% circa. Vediamo inoltre che la perdita produttiva massima osservata è del 70% circa, quindi possiamo immaginare una perdita produttiva massima asintotica del 75%.

```
YL <- (YWF - competition$Yield)/YWF * 100
mod1 <- nls(YL ~ i * Dens / (1 + i * Dens / A),
            start = list(i = 6.5, A = 75),
            data = competition)
summary(mod1)
##
## Formula: YL ~ i * Dens/(1 + i * Dens/A)
##
## Parameters:
##   Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## i      8.207      1.187   6.914 1.93e-08 ***
## A     75.049      2.353  31.894 < 2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 6.061 on 42 degrees of freedom
##
## Number of iterations to convergence: 3
## Achieved convergence tolerance: 7.497e-06
```

Qual è il problema di questo approccio? Se ci facciamo caso, questo modello prevede che, quando la fittezza delle piante infestanti è 0 (testimone non infestato), la perdita produttiva è 0. Di conseguenza la produzione osservata deve essere pari alla media del testimone non infestato. Insomma, abbiamo involontariamente imposto il vincolo  $YWF = 30.42637$ , anche se sappiamo che questo vincolo non ha alcuna giustificazione, dato che la media della popolazione da cui le nostre quattro osservazioni non inerbite derivano, difficilmente coincide con la media osservata.

Invece che riorganizzare i dati perché si adattino al modello, potremmo forse tentare di riorganizzare il modello, affinché si adatti meglio ai dati.

Dalla precedente funzione si ricava che:

$$Y_i = YWF - \frac{YL \times YWF}{100} = YWF \left(1 - \frac{YL}{100}\right)$$

che mostra come la produzione in una qualunque parcella ( $Y_i$ ) può essere ottenuta in funzione della perdita produttiva e di  $YWF$ . Considerando l'equazione precedente e il modello delle perdite produttive, possiamo scrivere:

$$Y_i = YWF \left(1 - \frac{iD}{100 \left(1 + \frac{iD}{A}\right)}\right)$$

Questa equazione consente di utilizzare i dati produttivi osservati come variabile dipendente e di stimare i parametri competitivi  $i$  ed  $A$ , insieme alla produzione stimata in assenza di competizione.

```
modComp <- nls(Yield ~ YWF * (1 - (i*Dens)/(100 * (1 + i * Dens/A))),
               list(YWF = 30.4, i = 6.5, A = 75),
               data=competition)
summary(modComp)
##
## Formula: Yield ~ YWF * (1 - (i * Dens)/(100 * (1 + i * Dens/A)))
##
## Parameters:
##      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## YWF      30.472      0.930  32.765 < 2e-16 ***
## i         8.240      1.387   5.943 5.22e-07 ***
## A        75.073      2.422  30.998 < 2e-16 ***
## ---
```

```
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1  
##  
## Residual standard error: 1.866 on 41 degrees of freedom  
##  
## Number of iterations to convergence: 3  
## Achieved convergence tolerance: 9.819e-06
```

Vediamo che, in questo caso, la produzione nel testimone non infestato non è più fissata al valor medio osservato, ma è stimata utilizzando tutti i dati sperimentali ed è, pertanto, più precisa.

Pur essendo entrambi gli approcci corretti, il secondo è certamente più elegante e attendibile.

### 13.9.2 Altre letture

1. Bates, D.M., Watts, D.G., 1988. Nonlinear regression analysis & its applications. John Wiley & Sons, Inc., Books.
2. Bolker, B.M., 2008. Ecological models and data in R. Princeton University Press, Books.
3. Carroll, R.J., Ruppert, D., 1988. Transformation and weighting in regression. Chapman and Hall, Books.
4. Ratkowsky, D.A., 1990. Handbook of nonlinear regression models. Marcel Dekker Inc., Books.
5. Ritz, C., Streibig, J.C., 2008. Nonlinear regression with R. Springer-Verlag New York Inc., Books.

## Capitolo 14

### Appendice 1: breve introduzione ad R

#### Cosa è R?

R è un software cugino di S-PLUS, con il quale condivide la gran parte delle procedure ed una perfetta compatibilità. Rispetto al cugino più famoso, è completamente freeware (sotto la licenza GNU General Public Licence della Free Software Foundation) ed è nato proprio per mettere a disposizione degli utenti un software gratuito, potente, mantenendo comunque la capacità di lavorare in proprio senza usare software di frodo.

E'uno strumento molto potente, anche da un punto di vista grafico, ma necessita di una certa pratica, in quanto manca di una vera e propria interfaccia grafica (Graphical User Interface: GUI) e, di conseguenza, è spesso necessario scrivere codice.

Inoltre, si tratta di un programma *Open Source*, cioè ognuno può avere accesso al suo codice interno ed, eventualmente, proporne modifiche. Altro vantaggio è che, oltre che un programma, R è anche un linguaggio *object oriented*, che può essere utilizzato dall'utente per creare funzioni personalizzate.

**Per evitare noiosi errori che possono essere molto comuni per chi è abituato a lavorare in ambiente WINDOWS, è bene precisare subito che R, come tutti i linguaggi di derivazione UNIX, è *case sensitive*, cioè distingue tra lettere maiuscole e lettere minuscole.**

## Oggetti e assegnazioni

### Costanti e vettori

R lavora con valori, stringhe di caratteri, vettori e matrici, che vengono assegnati alle variabili con opportuni comandi. Ad esempio, il comando:

```
y <- 3
y
## [1] 3
```

assegna il valore 3 alla variabile *y*. Invece il comando:

```
x <- c(1, 2, 3)
x
## [1] 1 2 3
```

crea un vettore *x* contenente i numeri 1,2 e 3. Bisogna precisare che il ‘vettore’, in R, non ha alcun legame con la fisica o l’algebra, ed è semplicemente una collezione di numeri (o stringhe) consecutivi.

Gli elementi dei vettori possono essere richiamati con il relativo indice tra parentesi quadre. Ad esempio, il secondo elemento di ‘x’ può essere richiamato come:

```
x[2]
## [1] 2
```

I vettori possono essere numerici, oppure a stringa, cioè possono contenere caratteri alfanumerici. Ad esempio, nel codice sottostante abbiamo creato un vettore contenente nomi di persona.

```
nomi <- c("Andrea", "Luca", "Sandro", "Mario")
nomi
## [1] "Andrea" "Luca" "Sandro" "Mario"
```

Un oggetto leggermente diverso è il fattore sperimentale (‘factor’), che contiene caratteri alfanumerici (come nel caso precedente), ma rappresenta una variabile qualitativa di classificazione in categorie.

```
classe <- factor(c("Uomo", "Uomo", "Donna", "Donna", "Donna"))
classe
## [1] Uomo Uomo Donna Donna Donna
## Levels: Donna Uomo
```



## Matrici

Oltre ai vettori, in R possiamo definire le matrici. Ad esempio il comando:

```
z <- matrix(c(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), 2, 4,
            byrow=TRUE)
```

crea una matrice *z* a 2 righe e 4 colonne, contenente i numeri da 1 a 8. La matrice viene riempita per riga.

Come già mostrato, per visualizzare il contenuto di una variabile basta digitare il nome della variabile. Ad esempio:

```
z
##      [,1] [,2] [,3] [,4]
## [1,]    1    2    3    4
## [2,]    5    6    7    8
```

Gli elementi di una matrice possono essere richiamati con gli indici e, dato che vi sono due dimensioni (righe e colonne), abbiamo bisogno di due indici, separati da virgole:

```
z[1,3]
## [1] 3
```

## Dataframe

Oltre a vettori e matrici, in R esiste un altro importante oggetto, cioè il *dataframe*, costituito da una tabella di dati con una o più colonne di variabili e una o più righe di dati. A differenza della matrice, il dataframe può essere utilizzato per memorizzare variabili di diverso tipo (numeri e caratteri). Un dataframe può essere creato unendo più vettori, come nell'esempio seguente.

```
parcelle <- c(1, 2, 3, 4, 5, 6)
tesi <- factor(c("A", "A", "B", "B", "C", "C"))
dati <- c(12, 15, 16, 13, 11, 19)
tabella <- data.frame("Parc"=parcelle,"Tesi"=tesi,"Produzioni"=dati)
tabella
##   Parc Tesi Produzioni
## 1    1    A          12
## 2    2    A          15
## 3    3    B          16
```

```
## 4      4      B      13
## 5      5      C      11
## 6      6      C      19
```

Per utilizzare i dati in un dataframe, bisognerà accedere ai singoli vettori colonna che lo costituiscono. Per far questo possiamo utilizzare l'estrattore `$`:

```
tabella$Parc
## [1] 1 2 3 4 5 6
```

oppure possiamo utilizzare gli indici, che come nel caso delle matrici, sono due, uno per le righe e uno per le colonne, separati da virgole:

```
tabella[2,1]
## [1] 2
```

## Quale oggetto sto utilizzando?

Per avere informazioni sulla natura di un oggetto creato in R, posso usare la funzione `str()`, come nell'esempio seguente:

```
str(tabella)
## 'data.frame':    6 obs. of  3 variables:
## $ Parc      : num  1 2 3 4 5 6
## $ Tesi      : Factor w/ 3 levels "A","B","C": 1 1 2 2 3 3
## $ Produzioni: num  12 15 16 13 11 19
```

Vediamo infatti che R ci informa che l'oggetto 'tabella' è in realtà un dataframe composto da tre colonne, di cui la prima e la terza sono numeriche, mentre la seconda è una variabile qualitativa (fattore).

Inoltre, esiste un'altra funzione molto comune in R, che permette di ottenere informazione riassuntive su un oggetto. Si tratta della funzione 'summary()', che fornisce un output diverso a seconda dell'oggetto che le viene passato come argomento:

```
summary(nomi)
##      Length      Class      Mode
##           4 character character
summary(classe)
## Donna Uomo
##      3      2
summary(tabella)
##      Parc      Tesi      Produzioni
```

```
## Min.      :1.00    A:2   Min.      :11.00
## 1st Qu.:2.25    B:2   1st Qu.:12.25
## Median :3.50    C:2   Median :14.00
## Mean     :3.50           Mean     :14.33
## 3rd Qu.:4.75           3rd Qu.:15.75
## Max.      :6.00           Max.      :19.00
```

## Operazioni ed operatori

Gli oggetti numerici possono essere manipolati anche con opportune operazioni algebriche, che si eseguono utilizzando i normali operatori (+, -, \*, /). Ad esempio:

```
f <- 2 * y
f
## [1] 6
```

## Funzioni ed argomenti

Per eseguire operazioni particolari si utilizzano, in genere, le funzioni. Una funzione è richiamata con un nome ed uno o più argomenti. Ad esempio, il comando:

```
log(5)
## [1] 1.609438
```

Calcola il logaritmo naturale di 5 e richiede un solo argomento, cioè il numero di cui calcolare il logaritmo. Al contrario, il comando:

```
log(100, 2)
## [1] 6.643856
```

Calcola il logaritmo in base 2 di 100 e richiede due argomenti, cioè il numero di cui calcolare il logaritmo e la base del logaritmo. Quando sono necessari due o più argomenti essi debbono essere messi nell'ordine esatto (in questo caso prima il numero poi la base) oppure debbono essere utilizzati i riferimenti corretti. Ad esempio, i due comandi:

```
log(100, base=2)
## [1] 6.643856
```

```
log(base=2, 100)
## [1] 6.643856
```

restituiscono lo stesso risultato, al contrario dei due comandi seguenti:

```
log(100, 2)
## [1] 6.643856
log(2, 100)
## [1] 0.150515
```

## Consigli per l'immissione di dati sperimentali

I dati delle prove sperimentali si possono o importare in R da altri software (ad esempio Excel) oppure si possono digitare direttamente in R. In quest'ultimo caso, in genere, si crea un vettore per ogni colonna di dati e, successivamente, si riuniscono i vettori in un dataframe, che viene poi salvato nel workspace, come vedremo in seguito.

### Immissione manuale di dati

L'immissione dei dati in R (e quindi la creazione di vettori) può essere velocizzata utilizzando la funzione `scan()`, separando i dati con INVIO (questo è comodo perchè ci permette di lavorare senza abbandonare il tastierino numerico!). L'immissione termina quando si digita un INVIO a vuoto.

```
dati <- scan()
1: 12
2: 14
3: 16
4: 18
5: 20
6:
Read 5 items
dati
[1] 12 14 16 18 20
```

La stessa funzione può essere anche utilizzata per immettere comodamente stringhe di caratteri, con un opportuno impiego dell'argomento `what`. In questo caso è possibile omettere le virgolette.

```

tesi <- scan(what = "character")
1: aurelio
2: aurelio
3: aurelio
4: claudio
5: claudio
6: claudio
7: latino
8: latino
9: latino
10:
Read 9 items
tesi
[1] "aurelio" "aurelio" "aurelio" "claudio"
    "claudio" "claudio" "latino" "latino" "latino"
>

```

## Immissione di numeri progressivi

Per creare una serie progressiva, si può utilizzare il comando `seq(n,m,by=step)` che genera una sequenza da  $n$  a  $m$  con passo pari a  $step$ .

```

options(width = 55)
parcelle <- seq(1,50,1)
parcelle
## [1] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
## [18] 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34
## [35] 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

```

## Immissione dei codici delle tesi e dei blocchi

A volte i codici delle tesi sono sequenze ripetute di stringhe. Ad esempio, i primi quattro dati potrebbero essere riferiti alla varietà BAIO, i secondi quattro alla varietà DUILIO, i successivi quattro alla varietà PLINIO. Per creare velocemente questo vettore, possiamo utilizzare la funzione `rep()`, in questo modo.

```

options(width = 55)
tesi <- factor(c("BAIO", "DUILIO", "PLINIO"))
tesi

```

```
## [1] BAIO    DUILIO PLINIO
## Levels: BAIO DUILIO PLINIO
tesi <- rep(tesi,each=4)
tesi
## [1] BAIO  BAIO  BAIO  BAIO  DUILIO DUILIO DUILIO
## [8] DUILIO PLINIO PLINIO PLINIO PLINIO
## Levels: BAIO DUILIO PLINIO
```

Notare l'uso della funzione `factor()` per creare un vettore di dati qualitativi (fattore). Allo stesso modo, per immettere i codici dei blocchi possiamo utilizzare la stessa funzione in un modo diverso. Ammettiamo infatti che i quattro valori di ogni tesi appartengano rispettivamente ai quattro blocchi; si opera quindi in questo modo.

```
tesi <- (c (1, 2, 3, 4))
tesi <- rep(tesi, times=3)
tesi
## [1] 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4
```

## Leggere e salvare dati esterni

Oltre che immessi da tastiera, i dati possono essere importati in R da files esterni. Inoltre, gli oggetti di R creati nel corso di una sessione possono essere memorizzati su files esterni. Partiamo dal presupposto di aver creato (come frequentemente avviene) il nostro database con EXCEL e di volerlo importare in R nel DATAFRAME *dati*.

Creiamo in EXCEL la tabella riportata di seguito, che si riferisce a 20 piante di mais.

Pianta	Var	Altezza
1	N	172
2	S	154
3	V	150
4	V	188
5	C	162
6	N	145
7	C	157
8	C	178
9	V	175
10	N	158
11	N	153

Pianta	Var	Altezza
12	N	191
13	S	174
14	C	141
15	N	165
16	C	163
17	V	148
18	S	152
19	C	169
20	C	185

La procedura è la seguente:

1. salviamo questa tabella nel file di testo: *comma delineated* 'import.csv'. Per far questo scegliere 'Menù - File - Salva con nome'. Scegliere un nome per il file ed indicare: 'Tipo file = CSV (delimitato dal separatore di elenco) (\*.csv). Salvare quindi il file in una directory prescelta.
2. Avviare una sessione R, cambiare la directory predefinita del sistema, scegliendo, con il menu File - Change Directory, la cartella nella quale abbiamo memorizzato il file di importazione.
3. Leggere il file di testo in un dataframe, con il seguente comando:

```
setwd("myWorkingDir")
dati <- read.csv("import.csv", header=TRUE)
```

Il comando appena descritto ha successo per file CSV creati con la versione inglese di Windows, caratterizzati dal punto come separatore decimale e dalla virgola come separatore di elenco. Se invece il computer fosse settato all'italiana, con la virgola come separatore decimale e il punto e virgola come separatore di elenco, allora si potrebbe utilizzare la funzione `read.csv2()` (stessa sintassi). Con questi due comandi, in R viene creato un dataframe di nome `dati`, contenente le tre colonne della tabella 'import.csv' appena creata, comprese le intestazioni di colonna.

I dati contenuti in un dataframe o in qualunque altro oggetto possono essere salvati in un file esterno (in formato R binario):

```
save(file="dati1.rda", dati)
```

ed eventualmente ricaricati:

```
load("dati1.rda")
```

Per scrivere in un file di testo (in questo caso *comma delineated*, ma il separatore di elenco può essere modificato secondo le nostre esigenze con l'argomento `sep`) si utilizza il seguente comando:

```
write.table(dati, "residui.csv", row.names=FALSE,
            col.names=TRUE, sep=",")
```

## Alcune operazioni comuni sul dataset

### Selezionare un subset di dati

E' possibile estrarre da un dataframe un subset di dati utilizzando la funzione:

```
subset(dataframe, condizione)
```

Ad esempio, se consideriamo il dataframe `tabella` creato in precedenza, è possibile selezionare tutte le righe relative alle Tesi A e C come segue:

```
tabella2 <- subset(tabella, Tesi == "A" | Tesi == "C")
tabella2
##   Parc Tesi Produzioni
## 1     1    A         12
## 2     2    A         15
## 5     5    C         11
## 6     6    C         19
```

Notare il carattere “|” che esprime la condizione logica OR. La condizione logica AND si esprime con il carattere “&”. L'esempio seguente isola i record in cui le varietà sono A o C e, contemporaneamente, la produzione è minore di 19.

```
tabella3 <- subset(tabella, Tesi == "A" | Tesi == "C" &
                  Produzioni < 19)
tabella3
##   Parc Tesi Produzioni
## 1     1    A         12
## 2     2    A         15
## 5     5    C         11
```



## Ordinare un vettore o un dataframe

Un vettore (numerico o carattere) può essere ordinato con il comando `sort`:

```
y <- c(12, 15, 11, 17, 12, 8, 7, 15)
sort(y, decreasing = FALSE)
## [1] 7 8 11 12 12 15 15 17
z <- c("A", "C", "D", "B", "F", "L", "M", "E")
sort(z, decreasing = TRUE)
## [1] "M" "L" "F" "E" "D" "C" "B" "A"
```

Un dataframe può essere invece ordinato con il comando `order()`, facendo attenzione al segno meno utilizzabile per l'ordinamento decrescente.

```
dataset[order(dataset$z, dataset$y), ]
dataset[order(dataset$z, -dataset$y), ]
```

## Workspace

Gli oggetti creati durante una sessione di lavoro vengono memorizzati nel cosiddetto workspace. Per il salvataggio del workspace nella directory corrente si usa il menu (File/Save Workspace) oppure il comando:

```
save.image('nomefile.RData')
```

Il contenuto del workspace viene visualizzato con:

```
ls()
```

Il workspace viene richiamato da menu (File/Open Workspace) oppure con il comando:

```
load('nomefile.RData')
```

Per un lavoro efficiente in R è bene tenere il workspace molto pulito, eliminando gli oggetti non necessari. La completa eliminazione degli oggetti nel workspace si esegue con:

```
rm(list=ls())
```

Uno o più oggetti specifici possono essere eliminati con:

```
rm(oggetto1, oggetto2, .....)
```

Gli oggetti possono anche essere richiamati in base alla loro posizione; ad esempio il comando:

```
rm(list=ls()[3:4])
```

elimina il terzo e il quarto oggetto dal workspace.

Un comando particolarmente utile è il seguente:

```
rm(list=ls()[ls()!="oggetto1"])
```

che permette di eliminare dal workspace ogni oggetto meno “oggetto1”. Si possono utilizzare anche clausole logiche più articolate come la seguente:

```
rm(list=ls()[ls()!="oggetto1" & ls()!="oggetto2"])
```

che elimina tutto meno “oggetto1” e “oggetto2”.

## Script o programmi

Come è possibile memorizzare dati e workspace, è anche possibile creare uno script (procedura, funzione...) da memorizzare e richiamare in seguito. Nel caso più semplice è possibile scrivere comandi in un semplice editor di testo e salvarli in un file con estensione ‘.r’. I comandi possono poi essere riutilizzati per semplice copia ed incolla sulla console, oppure, nel caso in cui si utilizzi Rstudio (FILE -> APRI SCRIPT o NUOVO SCRIPT) selezionando il comando (o i comandi) da inviare alla console e premendo la combinazione CTRL + INVIO.

Lavorare con scripts è molto comodo e consigliabile perchè non si deve partire da zero ad ogni sessione, ma è sufficiente correggere i comandi digitati in sessioni precedenti.

Oltre agli script, è possibile creare funzioni personalizzate fino ad arrivare a veri e propri programmi (packages). Immaginiamo ad esempio di voler scrivere una funzione che, dato il valore della produzione rilevata in una parcella di orzo di 20 \$ m<sup>2</sup> \$ (in kg) e la sua umidità percentuale, calcoli automaticamente il valore della produzione secca in kg/ha. La funzione che dobbiamo implementare è:

$$PS = PU \cdot \frac{100 - U}{100} \cdot \frac{10000}{20}$$

ove PS è la produzione secca in kg/ha e PU è la produzione all’umidità U in kg per 20 \$ m<sup>2</sup> \$.

Scriveremo un file di testo (ad esempio con il *Block notes* o con l'editor interno ad R):

```
PS <- function(PU, U) {
  PU*((100-U)/100)*(10000/20)
}
```

Notare l'uso delle parentesi graffe. Salveremo il file di testo con il nome (ad esempio) "prova.r".

Aperto una nuova sessione in R, possiamo ricaricare in memoria il file di programma (FILE - SORGENTE CODICE R, oppure da console, con il comando:

```
source('prova.r')
```

A differenza di quanto avviene con uno script, i comandi memorizzati nella funzione non vengono eseguiti, ma la funzione 'PS' diviene disponibile nel workspace e può essere utilizzata nel modo seguente:

```
PS(20,85)
```

## Interrogazione di oggetti

A differenza di altri linguaggi statistici come SAS o SPSS, R immagazzina i risultati delle analisi negli oggetti, mostrando un output video piuttosto minimale. Per ottenere informazioni è necessario interrogare opportunamente gli oggetti che al loro interno possono contenere altri oggetti da cui recuperare le informazioni interessanti. Gli oggetti che contengono altri oggetti sono detti **liste**.

Ad esempio, se vogliamo calcolare autovettori ed autovalori di una matrice, utilizziamo la funzione 'eigen'. Questa funzione restituisce una lista di oggetti, che al suo interno contiene i due oggetti values (autovalori) e vectors (autovettori). Per recuperare l'uno o l'altro dei due risultati (autovettori o autovalori) si usa l'operatore di concatenamento (detto anche estrattore) \$.

```
matrice <- matrix(c(2,1,3,4),2,2)
matrice
##      [,1] [,2]
## [1,]    2    3
## [2,]    1    4
```

```

ev <- eigen(matrice)
ev
## eigen() decomposition
## $values
## [1] 5 1
##
## $vectors
##          [,1]      [,2]
## [1,] -0.7071068 -0.9486833
## [2,] -0.7071068  0.3162278
ev$values
## [1] 5 1
ev$vectors
##          [,1]      [,2]
## [1,] -0.7071068 -0.9486833
## [2,] -0.7071068  0.3162278

```

## Altre funzioni matriciali

Oltre che autovettori ed autovalori di una matrice, R ci permette di gestire altre funzioni di matrice. Se ad esempio abbiamo le matrici:

$$Z = \begin{pmatrix} 1 & 22 & 3 \end{pmatrix} \quad Y = \begin{pmatrix} 3 & 2 \end{pmatrix}$$

queste possono essere caricate in R con i seguenti comandi:

```

Z <- matrix(c(1,2,2,3),2,2)
Y <- matrix(c(3,2),1,2)

```

Possiamo poi ottenere la trasposta di Z con il comando:

```

t(Z)
##          [,1] [,2]
## [1,]      1   2
## [2,]      2   3

```

Possiamo moltiplicare Y e Z utilizzando l'operatore %\*%:

```

Y%*%Z
##          [,1] [,2]
## [1,]      7  12

```

Possiamo calcolare l'inversa di Z con:

```
solve(Z)
##      [,1] [,2]
## [1,]   -3    2
## [2,]    2   -1
```

## Cenni sulle funzionalità grafiche in R

R è un linguaggio abbastanza potente e permette di creare grafici interessanti. Ovviamente un trattamento esauriente esula dagli scopi di questo testo, anche se è opportuno dare alcune indicazioni che potrebbero essere utili in seguito. La funzione più utilizzata per produrre grafici è:

```
plot(x,y, type, xlab, ylab, col, lwd, lty...)
```

ovex ed y sono i vettori con le coordinate dei punti da disegnare. **Type** rappresenta il tipo di grafico ('p' produce un grafico a punti, 'l' un grafico a linee, 'b' disegna punti uniti da linee, 'h' disegna istogrammi), 'Title' disegna il titolo del grafico, sub il sottotitolo, xlab e ylab le etichette degli assi, col è il colore dell'oggetto, lwd il suo spessore, lty il tipo di linea e così via.

Per una descrizione più dettagliata si consiglia di consultare la documentazione on line. A titolo di esempio, i comandi mostrati qui sotto producono l'output in Figura 14.1.

```
x <- c(1, 2, 3, 4)
y <- c(10, 11, 13, 17)
plot(x, y, type = "p", col="red", lwd=5, xlab="Ascissa", ylab="Ordinata")
```

Per sovrapporre una seconda serie di dati alla prima possiamo utilizzare la funzione 'plot()', come sopra e, successivamente la funzione 'points()' per aggiungere la nuova serie. Il risultato è quello mostrato in Figura 14.2.

```
y2 <- c(17,13,11,10)
plot(x, y, type = "p", col="red", lwd=5, xlab="Ascissa", ylab="Ordinata")
points(x, y2, col="blue", lwd=5)
```

Se avessimo voluto sovrapporre una grafico a linee avremmo utilizzato la funzione 'lines()' al posto della funzione 'points()', ottenendo l'output in Figura 14.3.

```
plot(x, y, "p", col="red", lwd=5,xlab="Ascissa", ylab="Ordinata")
points(x, y2, col="blue", lwd=5)
lines(x, y2, col="blue", lwd=2)
```

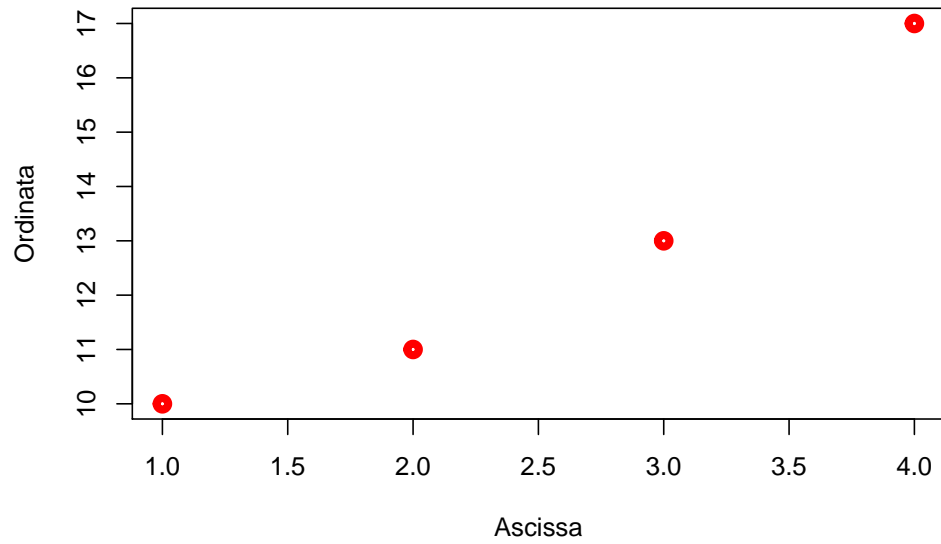


Figura 14.1: Esempio di un semplice grafico a dispersione

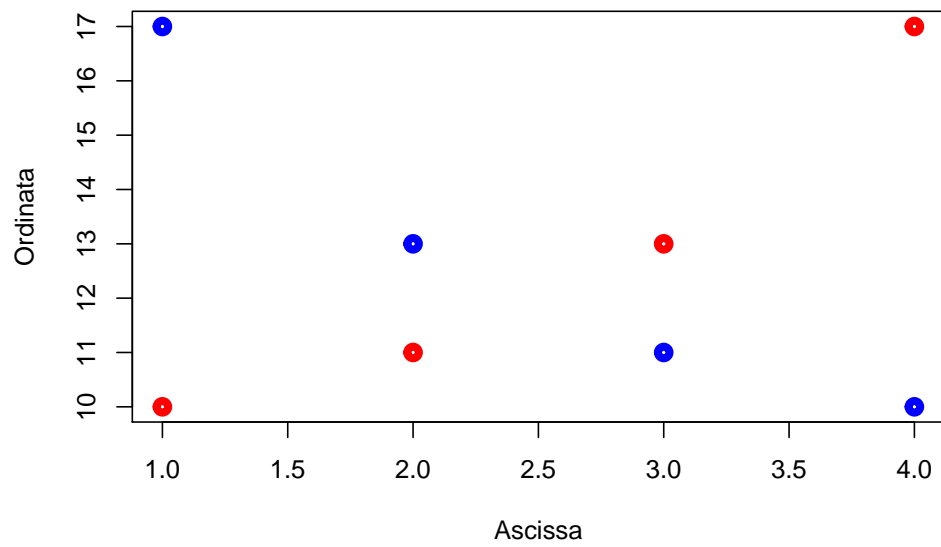


Figura 14.2: Esempio di grafico con due serie di dati

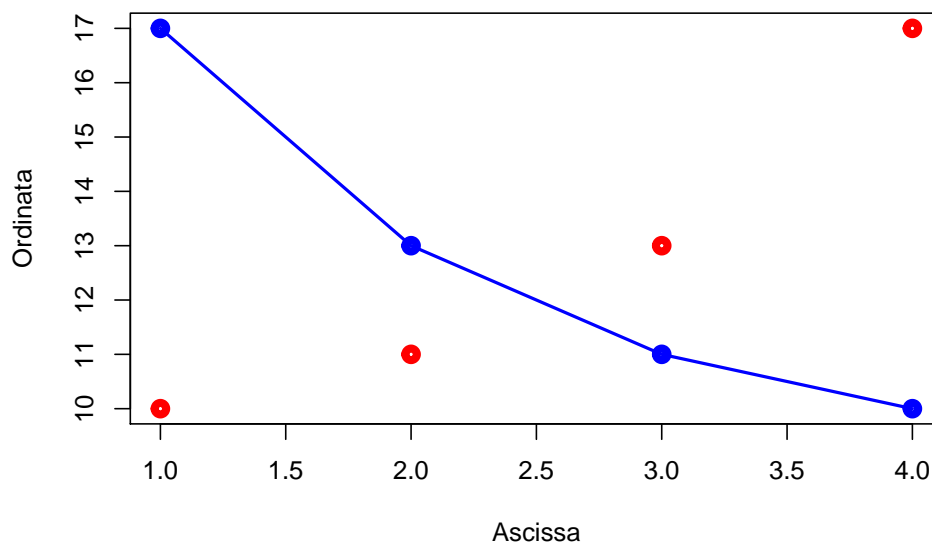


Figura 14.3: Esempio di grafico con due serie di dati, con linee e punti

Per disegnare una curva si può utilizzare la funzione:

```
curve(funzione, Xiniziale, Xfinale, add=FALSE/TRUE)
```

dove l'argomento 'add' serve per specificare se la funzione deve essere aggiunta ad un grafico preesistente.

Per aggiungere un titolo ad un grafico possiamo utilizzare la funzione:

```
title(main="Titolo")
```

mentre per aggiungere una legenda utilizziamo la funzione:

```
legend(Xcoord, YCoord, legend=c("Punti", "X+10"), pch=c(19, -1),
       col=c("Red", "Blue"),
       lwd=c(3, 3), lty=c(0, 3))
```

ove i vettori indicano, per ogni elemento della legenda, il testo che deve essere riportato (legend), il tipo di simbolo (pch, con -1 che indica nessun simbolo), il colore (col), la larghezza (lwd) e il tipo di linea (lty, con 0 che indica nessuna linea).

Ad esempio, il codice riportato più sotto produce l'output in Figura 14.4.

```
plot(x, y, "p", col="red", lwd=5, xlab="Ascissa",
     ylab = "Ordinata")
curve(10+x, add=TRUE, lty=1, lwd=2, col="blue")
title(main="Grafico di prova")
```

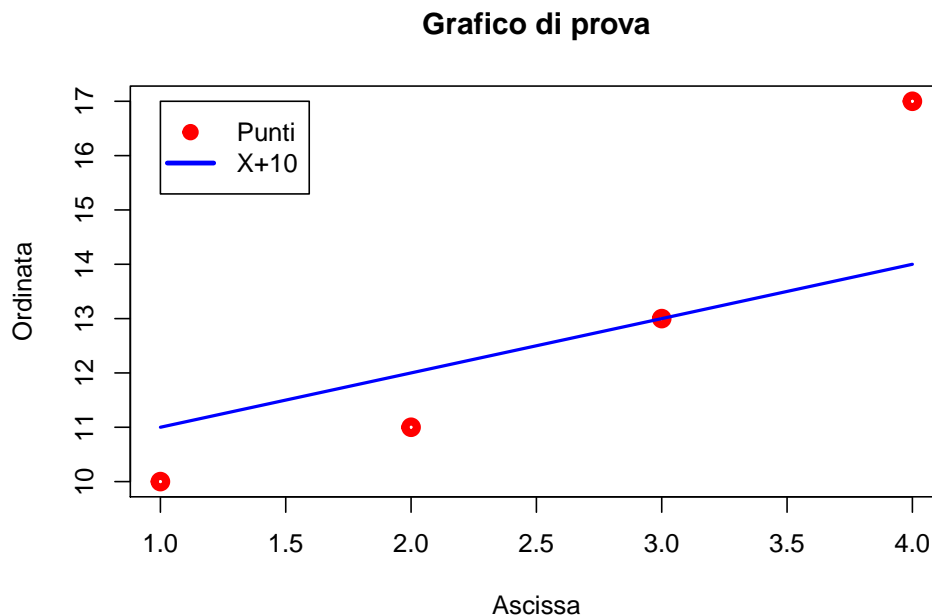


Figura 14.4: Esempio di grafico con titolo e legenda

```
legend(1,17, legend=c("Punti", "X+10"), pch=c(19,-1),
      col=c("Red", "Blue"), lwd=c(3,3), lty=c(0,1))
```

L'ultima cosa che desideriamo menzionare è la possibilità di disegnare grafici a torta, utilizzando il comando:

```
pie(vettoreNumeri, vettoreEtichette, vettoreColori)
```

Ad esempio il comando sottostante, produce l'output in Figura 14.5.

```
pie(c(20,30,50),label=c("B", "C"),
    col=c("blue", "green", "red"))
```

## 14.1 Per approfondire un po'...

1. Maindonald J. Using R for Data Analysis and Graphics - Introduction, Examples and Commentary. (PDF, data sets and scripts are available at JM's homepage.
2. Oscar Torres Reina, 2013. Introductio to RStudio (v. 1.3). This homepage



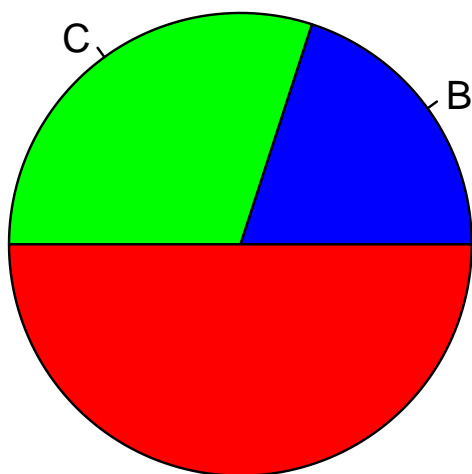


Figura 14.5: Esempio di grafico a torta

## Capitolo 15

### Appendice 2: Richiami di statistica descrittiva

#### Dati quantitativi: analisi chimiche e altre misurazioni fondamentali

Qualunque esperimento include un processo di misurazione, al termine del quale ci troviamo con un insieme di dati, usualmente definito dataset. Soprattutto se l'insieme è numeroso, è estremamente importante comprenderne le caratteristiche fondamentali e descriverle fedelmente, utilizzando opportune statistiche descrittive. Se le misure rappresentano una quantità, come, ad esempio, il peso, l'altezza, la concentrazione e così via, il dataset deve essere descritto in relazione ad almeno due caratteristiche fondamentali, vale a dire:

1. tendenza centrale (location)
2. dispersione (shape)

La tendenza centrale di un dataset è un valore, intorno al quale si collocano tutte le osservazioni, mentre la dispersione misura, in qualche modo, la distanza delle osservazioni tra di loro. Esistono diverse statistiche di tendenza centrale e dispersione; di seguito, descriveremo le più importanti.

## Indicatori di tendenza centrale

L'indicatore di tendenza centrale più diffuso è la *media* aritmetica, che non necessita di particolari spiegazioni: si calcola con R mediante la funzione `mean()`. Per esempio, carichiamo il dataset 'heights' contenuto nel package 'aomisc' e calcoliamo la media delle altezze.

```
library(aomisc)
data(heights)
mean(heights$height)
## [1] 164
```

Un altro indicatore di tendenza centrale è la *mediana*, data dal valore che bipartisce i dati in modo da lasciarne metà a sinistra e metà a destra. Se abbiamo una serie di individui ordinati in graduatoria, la mediana è data dall'individuo che occupa il posto  $(n + 1)/2$  o, se gli individui sono in numero pari, dalla media delle due osservazioni centrali. In R, la mediana si calcola con la funzione `median()`.

```
median(heights$height)
## [1] 162.5
```

La mediana è un indicatore più robusto della media: infatti, supponiamo di avere cinque valori:

1 - 4 - 7 - 9 - 10

La media è pari a 6.2, mentre la mediana è pari a 7 (valore centrale). Se cambiano il numero più alto in questo modo:

1 - 4 - 7 - 9 - 100

la media di questi cinque valori sarà 24.2, mentre la mediana sarà sempre pari a 7. Insomma, la mediana non è influenzata da valori estremi (*outliers*), in senso positivo o negativo.

## Indicatori di dispersione

Gli indicatori di tendenza centrale, da soli, non ci informano su come le unità sperimentali tendono a differire l'una dall'altra: ad esempio una media pari a 100 può essere ottenuta con tre individui che misurano 99, 100 e 101 rispettivamente o con tre individui che misurano 1, 100 e 199. E' evidente che in questo secondo gruppo gli individui sono molto più differenti tra loro (dispersi) che nel primo gruppo.

Pertanto, i risultati di un processo di misurazione non possono essere descritti solo con la media, ma è necessario anche calcolare un indice di variabilità. Tra essi, il più semplice è il *campo di variazione*, che è la differenza tra la misura più bassa e la misura più alta. In realtà, non si tratta di un vero e proprio indice di variabilità, in quanto dipende solo dai termini estremi della distribuzione e non necessariamente cresce al crescere della variabilità degli individui.

Invece del campo di variazione, possiamo utilizzare i cosiddetti *percentili*, che bipartiscono la popolazione di partenza in modo da lasciare una certa quantità di termini alla sua sinistra e la restante quantità alla sua destra. Ad esempio, il primo percentile bipartisce la popolazione in modo da lasciare a sinistra l'1% dei termini e alla destra il restante 99%. Allo stesso modo l'ottantesimo percentile bipartisce la popolazione in modo da lasciare a sinistra l'80% dei termini e alla destra il restante 20%. I percentili più utilizzati per descrivere la dispersione di un collettivo sono il 25-esimo e il 75-esimo: se questi sono molto vicini, significa che il 50 % dei soggetti è compreso in un intervallo piccolo e quindi la variabilità della popolazione è bassa. In R, i percentili si calcolano con il comando sottostante.

```
quantile(heights$height, probs = c(0.25, 0.75))
##      25%      75%
## 152.75 174.25
```

A questo proposito, possiamo introdurre il concetto di *boxplot* (grafico Box-Whisker). Si tratta di una scatola che ha per estremi il 25esimo e il 75esimo percentile ed è tagliata da una linea centrale in corrispondenza della mediana. Dalla scatola partono due linee verticali che identificano il valore massimo e il minimo. Se il massimo (o il minimo) distano dalla mediana più di 1.5 volte la differenza tra la mediana stessa e il 75esimo (o 25esimo) percentile, allora le linee verticali si fermano ad un valore pari ad 1.5 volte il 75esimo (o il 25esimo) percentile rispettivamente ed i dati esterni vengono raffigurati come outliers. I boxplot sono solitamente usati per descrivere campioni numerosi nei quali esista un qualche criterio di raggruppamento. In basso abbiamo creato tre gruppi con una funzione di estrazione di numeri casuali e li abbiamo rappresentati nel boxplot mostrato in Figura 15.1.

```
set.seed(1234)
A <- runif(20)
B <- runif(20)
C <- runif(20)
series <- rep(c("A", "B", "C"), each = 20)
```

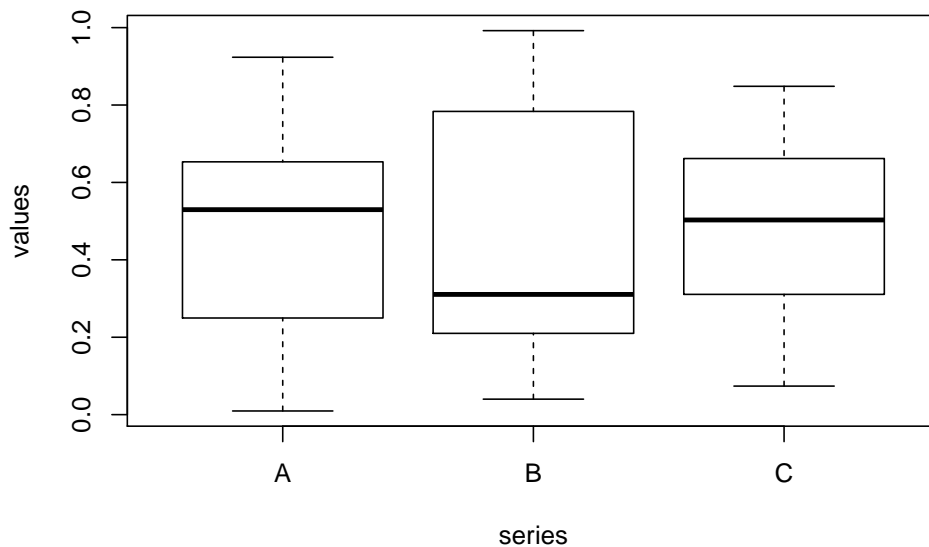


Figura 15.1: Esempio di boxplot in R

```
values <- c(A, B, C)
boxplot(values ~ series)
```

Oltre ad esprimere la variabilità di una popolazione con un intervallo (campo di variazione o coppia di percentili) è possibile utilizzare diversi indici sintetici di variabilità, tra cui i più diffusi sono la devianza, la varianza, la deviazione standard ed il coefficiente di variabilità.

La *devianza* (generalmente nota come SS, cioè somma dei quadrati) è data da:

$$SS = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Si tratta di un indicatore caratterizzato da significato geometrico molto preciso, collegabile alla somma dei quadrati delle distanze euclidee di ogni osservazione rispetto alla media. In R, non vi è una funzione per il calcolo della devianza (o meglio, esiste una possibilità nell'ambito dei modelli lineari, ma è troppo presto per introdurla...). Possiamo allora un'espressione del tipo:

```
sum( (heights$height - mean(heights$height))^2 )
## [1] 4050
```

Come misura di 'distanza', la devianza ha alcune importanti proprietà (che vedremo meglio in seguito), ma essendo una somma, il valore finale dipende dal numero di scarti da sommare e quindi non è possibile operare confronti tra collettivi formati da un diverso numero di individui. Si può quindi definire un altro indice, detto *varianza* (nei software di uso più corrente si parla di *varianza campionaria*, e definito come segue:

$$\sigma^2 = \frac{SS}{n-1}$$

La varianza permette di confrontare la variabilità di collettivi formati da un numero diverso di individui, anche se permane il problema che questo indicatore è espresso in un'unità di misura al quadrato, rispetto a quella delle osservazioni originali: ad esempio se le osservazioni sono espresse in metri, la varianza è espressa in metri quadrati.

Per eliminare questo problema si ricorre alla radice quadrata della varianza, cioè la *deviazione standard*, che si indica con  $s$ . La deviazione standard è espressa nella stessa unità di misura dei dati originari ed è quindi molto informativa sulla banda di oscillazione dei dati rispetto alla media.

Spesso la variabilità dei dati è in qualche modo proporzionale alla media: collettivi con una media alta hanno anche una variabilità alta e viceversa. Per questo motivo viene utilizzato spesso il *coefficiente di variabilità*:

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \times 100$$

che è un numero puro e non dipende dall'unità di misura e dall'ampiezza del collettivo, sicché è molto adatto ad esprimere ad esempio l'errore degli strumenti di misura e delle apparecchiature di analisi.

Varianza e deviazione standard sono molto facili da calcolare in R, grazie alle funzioni `var()`, `sd()`.

In genere, la deviazione standard, per le sue caratteristiche, viene utilizzata come indicatore dell'incertezza assoluta associata ad una determinata misurazione, mentre il coefficiente di variabilità (incertezza relativa percentuale; CV), è molto adatto ad esprimere l'errore degli strumenti di misura e delle apparecchiature di analisi.

```
var(heights$height)
## [1] 213.1579
sd(heights$height)
```

```
## [1] 14.59993
sd(heights$height)/mean(heights$height) * 100
## [1] 8.902395
```

## Arrotondamenti

Il calcolo della media e della deviazione standard (sia a mano che con il computer) porta all'ottenimento di un numero elevato di cifre decimali. E' quindi lecito chiedersi quante cifre riportare nel riferire i risultati della misura. L'indicazione generale, da prendere con le dovute cautele è che nel caso della media si riportano un numero di cifre decimali pari a quello rilevato nella misura, mentre per gli indicatori di variabilità si può utilizzare un decimale in più.

## Descrizione dei sottogruppi

In biometria è molto comune che il gruppo di unità sperimentali sia divisibile in più sottogruppi, dei quali vogliamo conoscere alcune statistiche descrittive. Abbiamo già visto il boxplot; ora potremmo voler calcolare le medie per gruppo. Per questo, possiamo utilizzare la funzione 'tapply()':

```
with(heights, tapply(height, var, mean) )
##      C      N      S      V
## 165.00 164.00 160.00 165.25
```

dove `height` è la variabile che contiene i valori da mediare, `var` è la variabile che contiene la codifica di gruppo, `mean` è la funzione che dobbiamo calcolare. Ovviamente `mean` può essere sostituito da qualunque altra funzione ammissibile in R, come ad esempio la deviazione standard.

Spesso vogliamo calcolare più di una funzione (ad esempio, la media e la deviazione standard). Per questo possiamo utilizzare il package 'plyr' e la funzione 'ddply()':

```
library(plyr)
descript <- ddply(heights, ~var, summarise,
                  Media = mean(height),
                  SD = sd(height))

descript
##   var  Media      SD
## 1   C 165.00 14.36431
## 2   N 164.00 16.19877
```

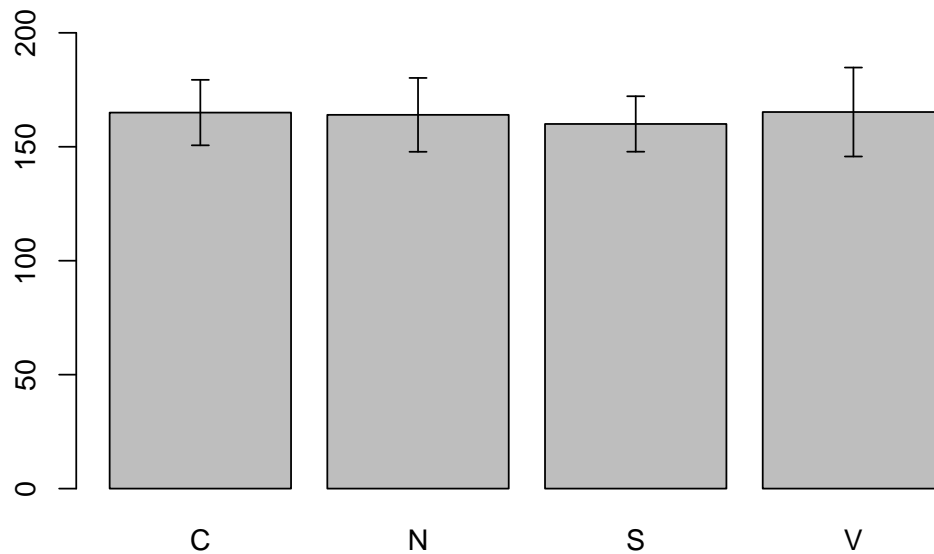


Figura 15.2: Esempio di boxplot in R

```
## 3   S 160.00 12.16553
## 4   V 165.25 19.51709
```

Con la funzione soprastante abbia creato un nuovo dataset (`descript`), che può essere utilizzato per il plotting, ad esempio per creare un grafico a dispersione, con l'indicazione della dispersione dei dati. Per sapere le coordinate relative al centro di ogni barra, dobbiamo creare un oggetto con la funzione `'barplot()'`. Questa funzione, oltre che disegnare il grafico, restituisce appunto le coordinate necessarie. Il codice sottostante produce l'output mostrato in Figura 15.2.

```
coord <- barplot(descript$Media, names.arg = descript$var,
                 ylim = c(0, 200))
arrows(coord, descript$Media - descript$SD,
       coord, descript$Media + descript$SD,
       length = 0.05, angle = 90, code = 3)
```

Il grafico non è bellissimo; per ora ci accontenteremo, ma, con un po' di esercizio, è possibile ottenere grafici di alto livello.



### 15.0.1 Relazioni tra variabili quantitative: correlazione

Se su ogni soggetto abbiamo rilevato due caratteri quantitativi è possibile studiare la coppia di variabili risultante per l'eventuale esistenza di variazione congiunta, che si ha quando al variare di una variabile cambia anche il valore dell'altra.

La variazione congiunta si quantifica tramite il *coefficiente di correlazione* costituito dal rapporto tra la codevianza (o somma dei prodotti) delle due variabili e il prodotto delle loro devianze. Il coefficiente di correlazione varia tra -1 e +1: un valore pari a +1 indica concordanza perfetta (tanto aumenta una variabile, tanto aumenta l'altra), mentre un valore pari a -1 indica discordanza perfetta (tanto aumenta una variabile tanto diminuisce l'altra). Un valore pari a 0 indica assenza di qualunque grado di variazione congiunta tra le due variabili (assenza di correlazione). Valori intermedi tra quelli anzidetti indicano correlazione positiva (se positivi) e negativa (se negativi).

Proviamo a considerare questo esempio: il contenuto di olio di 9 lotti di acheni di girasole è stato misurato con due metodi diversi ed è riportato più sotto.

```
a <- c(45, 47, 49, 51, 44, 37, 48, 44, 53)
b <- c(44, 44, 49, 53, 48, 34, 47, 46, 51)
```

Valutare la correlazione tra i risultati dei due metodi di analisi.

```
cor(a, b)
## [1] 0.8960795
```

Possiamo osservare che il coefficiente di correlazione è abbastanza vicino ad 1 e quindi possiamo concludere che esiste un buon grado di concordanza tra i due metodi di analisi.

## Dati qualitativi: conteggi e frequenze

Avendo a che fare con variabili qualitative, possiamo considerare la *frequenza assoluta*, cioè il numero degli individui che presentano una certa modalità. Ad esempio, se su 500 insetti 100 sono eterotteri, 200 sono imenotteri e 150 sono ortotteri, possiamo concludere che la frequenza assoluta degli eterotteri è pari a 100.

Oltre alle frequenze assolute, possiamo considerare anche le *frequenze relative*, che si calcolano dividendo le frequenze assolute per il numero totale degli individui del collettivo. Nel caso prima accennato, la frequenza relativa degli eterotteri è pari a  $100/500$ , cioè 0.2.

Se abbiamo una variabile nella quale le modalità possono essere logicamente ordinate, oltre alle frequenze assolute e relative possiamo prendere in considerazione le cosiddette *frequenze cumulate*, che si ottengono cumulando i valori di tutte le classi di frequenza che precedono quella considerata.

## Distribuzioni di frequenze e classamento

Quando rappresentiamo, in grafico o tabella, le frequenze (assolute, relative o cumulate) per tutte le classi e tutti gli individui del collettivo, otteniamo una *distribuzione di frequenze*. Le distribuzioni di frequenze possono essere costruite anche per le variabili quantitative, tramite un'operazione di classamento, che consiste nel creare classi con intervalli opportuni. Su queste distribuzioni di frequenza possiamo quindi calcolare frequenze assolute, relative e cumulate. In genere, se abbiamo un collettivo molto numeroso è conveniente aggregare i *dati* in forma di distribuzioni di frequenza, perché la lettura delle informazioni è molto più facile. Qui facciamo un esempio, anche se il dataset che utilizzeremo ('heights') non è così numeroso.

Vogliamo:

1. valutare la distribuzione delle frequenze assolute, relative e percentuali degli individui di ciascuna varietà;
2. valutare la distribuzione delle frequenze assolute, relative, percentuali e cumulate dell'altezza degli individui, considerando classi di ampiezza pari a 5 cm;
3. disegnare la torta delle frequenze relative della varietà e l'istogramma delle frequenze assolute dell'altezza.

La soluzione al punto 1 con R è facile, attraverso l'impiego della funzione `table()`. La funzione `length()` restituisce il numero di elementi in un vettore.

```
#Frequenze assolute
table(heights$var)
##
## C N S V
## 7 6 3 4
```

```
#Frequenze relative
with(heights, table(var)/length(var) )
## var
##    C    N    S    V
## 0.35 0.30 0.15 0.20
#Frequenze percentuali
with(heights, table(var)/length(var) * 100 )
## var
##  C  N  S  V
## 35 30 15 20
```

Per la variabile altezza, che è di tipo quantitativo, si utilizza lo stesso comando `table(vettore)`, ma occorre specificare l'ampiezza delle classi di frequenza con la funzione `cut()` e l'argomento `breaks()`, con il quale vengono specificati gli estremi superiori della classe (inclusi per default nella classe stessa). Per le frequenze cumulate si usa invece la funzione `cumsum()`.

```
freq <- table(cut (heights$height,
                   breaks = c(140,150,160,170,190,200)))
freq
##
## (140,150] (150,160] (160,170] (170,190] (190,200]
##           4         5         4         6         1
```

Una distribuzione di frequenze può essere rappresentata graficamente con un grafico a torte o a barre, che, in R, possono essere disegnati con le funzioni `pie()` e `barplot()`.

```
par(mfrow=c(1,2))
pie(table(heights$var))
barplot(freq, col="blue")
```

## Statistiche descrittive per le distribuzioni di frequenze

Il più semplice indicatore di tendenza centrale, utilizzabile con qualunque tipo di dati è la *moda*, cioè il valore della classe che presenta la maggior frequenza. Ovviamente, se la variabile è quantitativa, si assume come moda il punto centrale della classe con maggior frequenza. L'individuazione della moda è banale e non richiede calcoli di sorta.

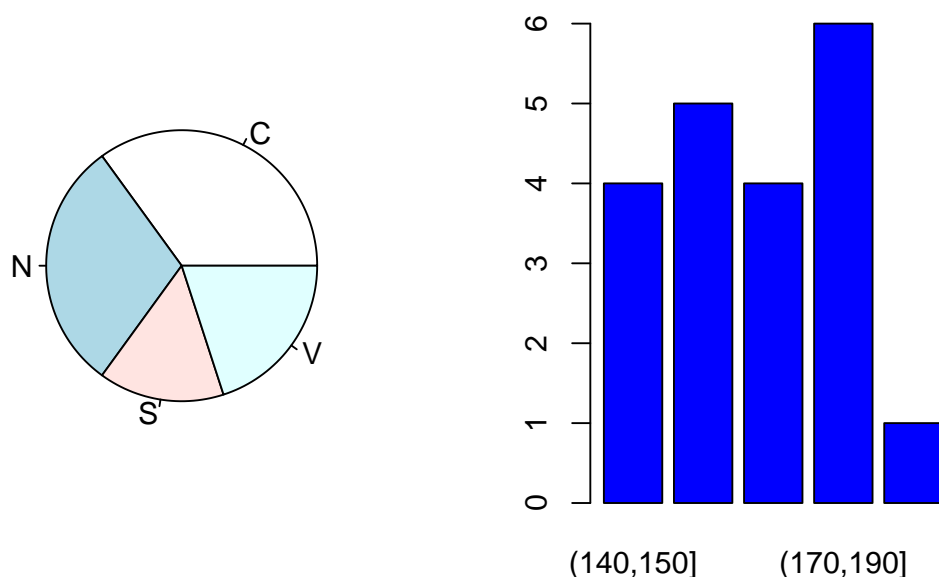


Figura 15.3: Rappresentazione di una distribuzione di frequenze, con un grafico a torta o a barre

Nel caso di distribuzioni di frequenza per caratteri ordinabili (qualitativi e quantitativi), oltre alla moda possiamo calcolare la *mediana* e gli altri percentili.

Oltre a questi, per le distribuzioni di frequenza di caratteri quantitativi è anche possibile calcolare la media, come illustrato in precedenza, insieme tutti gli indicatori di variabilità già citati.

## Distribuzioni di frequenza bivariate: le tabelle di contingenza

In alcuni casi in ciascuna unità sperimentale del collettivo vengono studiati due (o più) caratteri e, di conseguenza, si ha a che fare con distribuzioni di frequenza bivariate (o multivariate). In questo caso si possono costruire delle *tabelle di contingenza*, cioè delle tabelle a due entrate nelle quali ogni numero rappresenta la frequenza congiunta (in genere assoluta) per una particolare combinazione delle due variabili.

Ad esempio consideriamo le variabili Varietà (con i valori SANREMO e FANO) e 'Forma delle bacche' (con i valori LUNGO, TONDO, OVALE), riportati nella tabella di contingenza che creeremo come matrice.

```

tabCon <- matrix(c(37, 45, 32, 74, 61, 59), nrow = 2, ncol = 3,
                 byrow = F)
row.names(tabCon) <- c("SANREMO", "FANO")
colnames(tabCon) <- c("LUNGO", "TONDO", "OVALE")
tabCon
##           LUNGO TONDO OVALE
## SANREMO      37     32    61
## FANO         45     74    59

```

Ogni riga della tabella sovrastante costituisce una distribuzione condizionata della forma del frutto, dato un certo valore della Varietà, mentre ogni colonna costituisce una distribuzione condizionata della Varietà, data una certa forma del frutto.

## Connessione

Se guardiamo le due distribuzioni condizionate per SANREMO e FANO possiamo notare che esiste una certa differenza. Potremmo chiederci quindi se il presentarsi di una data modalità del carattere Varietà (SANREMO o FANO) influenza il presentarsi di una particolare modalità del carattere Forma del frutto. Se ciò non è vero si parla di indipendenza delle variabili (allora le distribuzioni condizionate sono uguali) altrimenti si parla di dipendenza o connessione. In caso di indipendenza, le distribuzioni condizionate delle due variabili dovrebbero essere uguali tra loro, cioè la frequenza relativa condizionale di X per una data modalità di Y deve essere uguale alla frequenza relativa condizionale di X per l'altra modalità di Y e quindi alla frequenza marginale di X.

Ad esempio, per il carattere LUNGO la frequenza relativa marginale è pari ad  $82/308=0.266$  (82 è la somma dei pomodori di forma allungata, mentre 308 è il numero totale dei pomodori); in caso di indipendenza, questa frequenza dovrebbe essere la stessa, indipendentemente dal fatto che il pomodoro sia di varietà SANREMO oppure Fano. In cifre, la frequenza assoluta condizionata per LUNGO|SANREMO dovrebbe essere pari a  $0.266 \times 130 = 34.6$ , mentre LUNGO|FANO dovrebbe essere pari a  $0.266 \times 178 = 47.4$ . Con questi principi, possiamo costruire la tabella delle frequenze assolute attese, in caso di indipendenza completa tra i due caratteri.

```

expF <- matrix(c(34.6, 47.4, 44.7, 61.3, 50.6, 69.4),
              nrow = 2, ncol = 3,
              byrow = F)

```

```
row.names(expF) <- c("SANREMO", "FANO")
colnames(expF) <- c("LUNGO", "TONDO", "OVALE")
```

A questo punto è logico costruire un indice statistico di connessione, detto  $\chi^2$ , che misuri lo scostamento tra le frequenze osservate e quelle attese nell'ipotesi di indipendenza perfetta:

$$\chi^2 = \sum \left[ \frac{(f_o - f_a)^2}{f_a} \right]$$

dove  $f_o$  sta per frequenza osservata ed  $f_a$  sta per frequenza attesa nel caso indipendenza. Questo indice assume valore pari a zero nel caso di indipendenza completa (le frequenze osservate sono uguali a quelle attese) ed assume un valore positivo tanto più alto quanto maggiore è la connessione tra i due caratteri, fino ad un valore massimo dato dal prodotto del numero degli individui per il valore minimo tra il numero di righe - 1 e il numero di colonne - 1:

$$\max \chi^2 = n \cdot \min(r - 1, c - 1)$$

Nel nostro caso, potremmo calcolare il chi quadro in questo modo:

```
sum( ((tabCon - expF) ^ 2) / expF )
## [1] 10.22348
```

Esiste anche un comando più semplice, che consiste nell'utilizzare la funzione `as.table()` per forzare la matrice `dati` in una tabella di contingenza ed applicare la funzione `summary()`.

```
summary( as.table (tabCon))
## Number of cases in table: 308
## Number of factors: 2
## Test for independence of all factors:
##  Chisq = 10.223, df = 2, p-value = 0.006027
```

Il valore massimo di chi quadro è pari a 308 e di conseguenza il valore osservato, espresso in relazione al valore massimo è pari a  $10.22/308=0.033$ . Si può quindi concludere che la connessione tra i due caratteri è piuttosto debole.

## Esercizi

### Esercizio 1

Scaricare il file EXCEL ‘rimsulfuron.xlsx’. In questo file sono riportati i risultati di un esperimento con 15 trattamenti e 4 repliche, nel quale sono stati posti a confronti diversi erbicidi e/o dosi per il diserbo nel mais. Calcolare le medie produttive ottenute con le diverse tesi sperimentali e riportarle su un grafico, includendo anche un’indicazione di variabilità. Verificare se la produzione è correlata con l’altezza delle piante e commentare i risultati ottenuti. Il file può essere scaricato da questo link.

### Esercizio 2

Caricare il datasets ‘students’ disponibile nel package ‘aomisc’. In questo file potete trovare una database relativo alla valutazione degli studenti in alcune materie del primo anno di Agraria. Ogni record rappresenta un esame, con il relativo voto, la materia e la scuola di provenienza dello studente. Con un uso appropriato delle tabelle di contingenza e del chi quadro, valutare se il voto dipende dalla materia e dalla scuola di provenienza dello studente.

---

## 15.1 Per approfondire un po’...

1. F. Crivellari (2006). Analisi statistica dei dati con R. Apogeo, Milano.
2. G. Leti e L. Cerbara (2009). Elementi di statistica descrittiva. Il Mulino Editore, Bologna.

## Capitolo 16

### Appendice 3: Split-plot, split-block e altro

In questo libro abbiamo affrontato le questioni più rilevanti in relazione all'attività di ricerca e sperimentazione, quelle che dovrebbero far parte del bagaglio culturale di ogni laureato in discipline scientifiche. Tuttavia, è chiaro che la trattazione non è affatto esaustiva e quindi, se si avesse l'intenzioni di accostarsi al mondo della ricerca scientifica, non si potrebbe prescindere dalla lettura di altri testi di approfondimento, che sono stati via via segnalati. Tuttavia, mi sembra opportuno discutere alcuni modelli che sono estremamente diffusi nella sperimentazione di pieno campo, nella speranza che ciò possa essere utile nella pratica operativa.

#### 16.1 Disegni a split-plot

Si parla di disegno a 'split-plot' (parcella suddivisa) quando un'unità sperimentale che ha subito (o è destinata a subire) un trattamento con il fattore sperimentale A, viene suddivisa in più sub-unità, alle quali vengono assegnati i diversi livelli di un altro fattore sperimentale (B), in modo randomizzato. Le sub-unità sperimentali non sono quindi indipendenti e viene a realizzarsi una sorta di raggruppamento tra di esse.

Nel disegno sperimentale a split-plot, le parcelle più grandi vengono definite 'parcelle principali' (main-plots) e ad esse viene allocato il fattore sperimentale di I ordine. Le parcelle più piccole sono invece dette parcelle elementari (sub-plots) e ad esse viene allocato il fattore di II ordine.



Un disegno a split-plot può rendersi necessario per i seguenti motivi:

1. un fattore sperimentale richiede parcelle più grandi dell'altro. Ad esempio, le lavorazioni del terreno, le irrigazioni o le epoche di semina, possono richiedere parcelle più grandi del diserbo, della concimazione o delle varietà. Di conseguenza si disegna l'esperimento per il fattore che richiede parcelle più grandi, che vengono poi suddivise per accomodare l'altro fattore sperimentale.
2. Uno dei due fattori sperimentali è più 'difficile' da assegnare rispetto all'altro e quindi è preferibile manipolare congiuntamente tutto il gruppo di unità sperimentali che deve riceverlo. Ad esempio, se vogliamo misurare la resistenza alla corrosione di barre d'acciaio con diversi rivestimenti e forgiate a diverse temperature, è evidente che la gestione della temperatura nella fornace è piuttosto complessa, perchè richiede tempi lunghi per essere resettata e raggiungere un nuovo equilibrio. Invece che preparare una fornace per ogni rivestimento (manipolazione indipendente delle unità sperimentali), si mettono nella stessa fornace tutte le unità sperimentali con i diversi rivestimenti. Una situazione analoga si può avere se vogliamo provare diverse miscele per torte (con vari ingredienti), e diversi tempi di cottura; dato che non è agevole preparare una miscela diversa per ogni tempo di cottura, potremmo preferire di preparare una miscela tutta insieme, per poi suddividerla tra i diversi tempi di cottura.
3. La disponibilità di unità sperimentali è limitata, come accade con gli armadi climatici, che vengono settati a diversa temperatura e all'interno delle quali vengono randomizzate le tesi sperimentali di secondo ordine.

### 16.1.1 Il caso-studio

Consideriamo l'esempio presentato nel capitolo 11, nel quale avevamo due fattori sperimentali a confronto: il diserbo, con due livelli (totale o localizzato sulla fila) e la lavorazione, con tre livelli (aratura profonda, aratura superficiale e *minimum tillage*). In quel capitolo abbiamo presentato l'esperimento come un fattoriale a blocchi randomizzati, la cui mappa di campo è stata riportata in Figura 11.2.

In realtà, questo esperimento non era stato pianificato come indicato in Figura 11.2, in quanto questo lay-out ci avrebbe costretto a lasciare parecchio spazio tra una parcella e l'altra, per poter manovrare con la macchina per la lavorazione del terreno. Per questo motivo, l'esperimento era stato disegnato a split-plot, in modo da raggruppare le parcelle caratterizzate dalla stessa

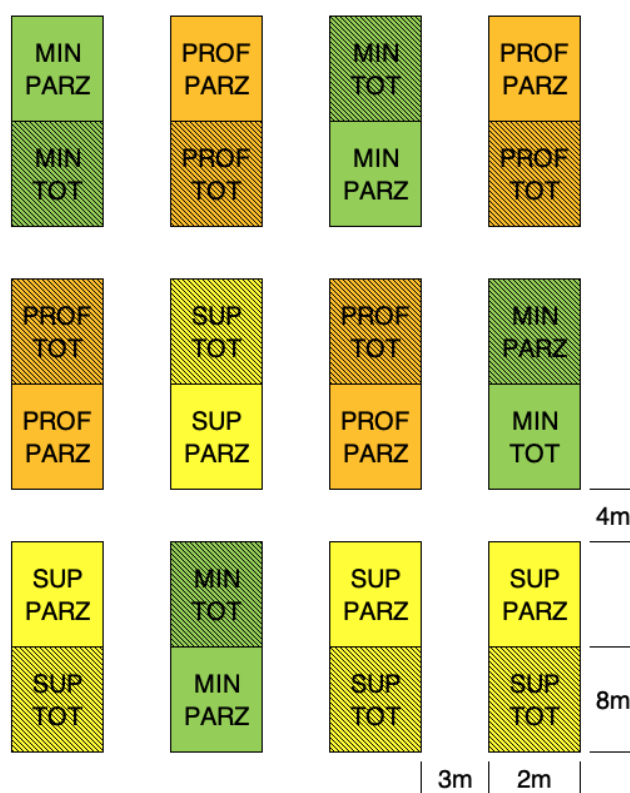


Figura 16.1: Schema sperimentale split-plot

lavorazione e quindi lavorare su superfici più ampie, lasciando inalterata la dimensione della parcella elementare. La reale mappa di campo è riportata in Figura 16.1.

Osservando la mappa dell'esperimento, possiamo fare le seguenti considerazioni.

1. Lo split-plot introduce un vincolo alla randomizzazione, in quanto il fattore di II ordine non è randomizzato liberamente, ma la sua randomizzazione è vincolata al fatto che tutti i suoi livelli debbono essere inseriti nella stessa parcella principale.
2. Ogni 'main-plot' funge da replica per le tesi di II ordine, ma non è vero il contrario. Ad esempio, se avessi un solo blocco, avrei tre repliche per il diserbo parziale e altrettante per il diserbo totale, ma avrei una e una sola replica per le lavorazioni.
3. Per quanto riguarda le lavorazioni, il disegno può essere assimilato ad un blocco randomizzato che trova la sua unità sperimentale (replica

vera) nella main-plot, in quanto è ad essa che sono stati allocati i trattamenti in modo indipendente. Per le lavorazioni, le sub-plots si comportano da sub-repliche, in quanto non sono trattate con le lavorazioni in modo indipendente l'una dall'altra (mentre i diserbi sono stati allocati in modo indipendente alle sub-plots).

4. La presenza delle main-plots non può mai essere dimenticata, in quanto essa da conto del fatto che due sub-parcelle nella stessa parcella principale sono più 'simili' di due sub-parcelle in due parcelle principali diverse. Insomma, se rimuoviamo la voce relativa alle parcelle principali rompiamo l'indipendenza degli errori sperimentali, venendo così a violare uno degli assunti fondamentali per l'ANOVA.

### 16.1.2 Definizione del modello lineare

Il modello ANOVA per un disegno a split-plot è simile a quello dell'ANOVA fattoriale, fatta salva la presenza di un effetto aggiuntivo, quello delle parcelle principali (main-plots), che costituiscono un elemento di raggruppamento delle osservazioni. Ad esempio, se una main-plot è più fertile di un'altra, tutte le osservazioni prese su questa main-plot saranno caratterizzate da un effetto positivo sulla produzione e, di conseguenza, saranno correlate tra di loro. In altre parole, la presenza di questo elemento comune, positivo o negativo che sia, rende le osservazioni prese su una main-plot più simili tra di loro che le osservazioni prese su main-plots diverse. Si parla, propriamente, di **correlazione intra-classe**, un concetto simile, ma non totalmente coincidente, con quello di correlazione di Pearson. E' evidente che l'effetto delle main-plots deve essere incluso nel modello, per evitare che finisca nel residuo e renda i residui correlati, cioè non indipendenti. Scriviamo quindi il modello:

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_k + \alpha_i + \theta_{ik} + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dove  $\gamma$  è l'effetto del blocco  $k$ ,  $\alpha$  è l'effetto della lavorazione  $i$ ,  $\beta$  è l'effetto del diserbo  $j$ ,  $\alpha\beta$  è l'effetto dell'interazione per la specifica combinazione della lavorazione  $i$  e del diserbo  $j$ . Abbiamo incluso anche  $\theta$  che è l'effetto della main-plot; dato che ogni parcella principale è identificata univocamente dal blocco  $k$  a cui appartiene e dalla lavorazione  $i$  in essa eseguita, abbiamo utilizzato i pedici corrispondenti.

Per la stima dei parametri, potremmo utilizzare il codice sottostante, anticipando però che è sbagliato, per i motivi che vedremo in seguito. Tuttavia,

è importante notare che abbiamo definito le main-plots come combinazione tra Blocchi e Lavorazioni.

```
mainPlot <- factor(dataset$Lavorazione):factor(dataset$Blocco)
mod.wrong <- lm(Prod ~ factor(Blocco) + Lavorazione*Diserbo + mainPlot, data=dat
```

### 16.1.3 La natura dell'effetto delle main-plots

Abbiamo anticipato che il modello sovrastante è sbagliato. Il problema è sia concettuale, che pratico. Da un punto di vista concettuale, noi abbiamo incluso le main-plots come un effetto fisso, al pari delle lavorazioni o del diserbo. In realtà c'è una grossa differenza: mentre i livelli delle lavorazioni e del diserbo li abbiamo attentamente prescelti, perché eravamo specificatamente interessati ad essi, nel caso delle main-plots non abbiamo nessun interesse specifico, le abbiamo selezionate come fossero le parcelle di un esperimento, in modo casuale da un universo più grosso, quello di tutte le main-plots possibili nel nostro appezzamento.

Insomma, stiamo dicendo che, mentre le lavorazioni ed il diserbo sono effetti cosiddetti fissi, le main-plots hanno un effetto di natura random: potremmo cambiarle a piacimento, senza che il nostro esperimento cambi o perda interesse. Cosa che non possiamo dire della lavorazione e del diserbo: se cambiamo i livelli inclusi nell'esperimento, cambia la finalità dello stesso.

Da un punto di vista pratico, se eseguiamo la scomposizione delle varianze con il modello sovrastante, tutti i test di F vengono effettuati utilizzando la varianza del residuo come denominatore. Tuttavia, per quanto riguarda le lavorazioni, i livelli sono stati allocati alle main-plots, non alle sub-plots e, pertanto, le repliche vere per questo fattore sperimentale sono le main-plots trattate con la stessa lavorazione, non le sub-plots. Ricordiamo che, secondo Fisher, l'errore sperimentale è definito come la variabilità tra repliche vere trattate allo stesso modo; di conseguenza, il residuo non è, e non può essere, la voce d'errore giusta per testare la significatività dell'effetto lavorazione.

Inoltre, se per un attimo immaginassimo di escludere il diserbo chimico e pensassimo di aver fatto un'unica misura per ogni main-plot, ci troveremmo di fronte ad un esperimento a blocchi randomizzati, nel quale le main-plots assumono il ruolo delle parcelle. In questo esperimento, l'errore residuo, sul quale testare la significatività dell'effetto della lavorazione, sarebbe dato proprio dalla devianza tra main-plots trattate allo stesso modo. Ovviamente,

lo stesso approccio dovrebbe essere mantenuto in un esperimento a split-plot.

Insomma, in un esperimento a split-plot, oltre ad includere le main-plots nel modello per assicurare l'indipendenza dei residui, è anche necessario trattare l'effetto main-plots come un effetto random, sul quale testare la significatività dell'effetto del fattore di I ordine.

### 16.1.4 Scomposizione della varianza

I risultati ottenuti con questo esperimento sono disponibili nel file 'beet.csv', che può essere aperto direttamente da gitHub, con il codice sottostante.

```
path1 <- "https://raw.githubusercontent.com/OnofriAndreaPG/"
path2 <- "aomisc/master/data/"
name <- "beet.csv"
pathName <- paste(path1, path2, name, sep = "")
dataset <- read.csv(pathName, header=T)
head(dataset)
##   Lavorazione Diserbo Blocco   Prod
## 1          MIN     tot      1 11.614
## 2          MIN     tot      2  9.283
## 3          MIN     tot      3  7.019
## 4          MIN     tot      4  8.015
## 5          MIN    parz      1  5.117
## 6          MIN    parz      2  4.306
```

Tutte le devianze sono uguali a quelle calcolate per un modello ANOVA a due vie. Rimane il problema di calcolare la devianza delle main-plots. Intuitivamente possiamo pensare di calcolarle attraverso la devianza delle medie ottenute in main-plots diverse. È giusto, ma è necessario ricordare che queste medie sono anche determinate dalla lavorazione che è stata eseguita in ciascuna main-plot e dal blocco di cui la main-plot fa parte. Pertanto, dalla devianza delle main-plots deve essere scorporata la devianza dei blocchi e quella delle lavorazioni.

Le produzioni medie in ogni main-plot sono:

```
medieMP <- tapply(dataset$Prod, mainPlot, mean)
medieMP
##   MIN:1  MIN:2  MIN:3  MIN:4  PROF:1  PROF:2
## 8.3655 6.7945 7.9795 6.8160 10.7940 9.7275
```

```
## PROF:3 PROF:4 SUP:1 SUP:2 SUP:3 SUP:4
## 9.2470 9.9025 8.9970 8.5205 8.4470 9.2685
```

La devianza, considerando che in ogni main-plot ci sono due osservazioni e considerando anche le devianze calcolate per l'ANOVA fattoriale a due vie, è quindi:

```
2 * sum( (medieMP - mean(dataset$Prod))^2 ) - 3.65959 - 23.65647
## [1] 3.658419
```

Questa devianza ha 6 gradi di libertà, in quanto abbiamo 12 main-plots, quindi 11 gradi di libertà, meno 2 gradi di libertà per le lavorazioni e tre gradi di libertà per i blocchi.

Per il resto, nulla cambia rispetto all'ANOVA fattoriale, salvo il fatto che il residuo è più piccolo ed ha meno gradi di libertà, in quanto da esso è stato scorporato l'effetto delle main-plots.

### 16.1.5 Il fitting con R

Il modello lineare per una disegno a split-plot ha due effetti random, cioè il residuo e l'effetto delle main-plots. Quando vi è più di un effetto random ed almeno un effetto fisso si parla di modelli misti (mixed models). In R ci sono molte funzioni per il fitting di questa classe di modelli, ma noi utilizzeremo la più semplice, anche se non necessariamente la più avanzata. Si tratta di 'aov()', nella quale l'effetto random delle main-plots viene immesso all'interno della funzione 'Error()' (notare la E maiuscola).

E'importante segnalare che la **funzione 'aov()' fornisce risultati corretti solo quando il disegno è bilanciato**, come in questo caso e in molti altricasi, nella sperimentazione agraria di pieno campo.

Il codice per il fitting è:

```
mod.split <- aov(Prod ~ factor(Blocco) + Lavorazione*Diserbo +Error(mainPlot), data=da
```

Le stime dei parametri non sono disponibili con questa funzione e la scomposizione della varianza può essere ottenuta con la funzione 'anova()' disponibile nel package 'aomisc', che deve essere installato e caricato. L'output presenta separatamente i due strati di errore, quello riferito alle main-plots e quello riferito alle sub-plots.

```
library(aomisc)
anova(mod.split)
##
```

```
## Error: mainPlot
##               Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## factor(Blocco) 3  3.660    1.22   2.001 0.2155
## Lavorazione    2 23.656   11.83  19.399 0.0024 **
## Residuals      6  3.658    0.61
## ---
## Signif. codes:
## 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Error: Within
##               Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Diserbo        1   3.32    3.320   1.225 0.2972
## Lavorazione:Diserbo 2  19.46    9.732   3.589 0.0714 .
## Residuals      9  24.40    2.711
## ---
## Signif. codes:
## 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Confrontando il risultato dell'analisi a split-plot con quella dell'analisi fattoriale esposta in una lezione precedente possiamo notare che l'interazione lavorazione x diserbo non è più significativa, mentre lo era nel caso del disegno fattoriale semplice. È evidente che i dati vanno elaborati seguendo il disegno sperimentale utilizzato per generarli, anche se ciò può diminuire la potenza dei test di F, per il più basso numero di gradi di libertà del residuo.

## Medie e SEM

Le medie marginali attese si ottengono come al solito, tramite la funzione `'emmeans()'`

```
library(emmeans)
medieA <- emmeans(mod.split, ~Lavorazione)
## Note: re-fitting model with sum-to-zero contrasts
## NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions
medieB <- emmeans(mod.split, ~Diserbo)
## Note: re-fitting model with sum-to-zero contrasts
## NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions
medieAB <- emmeans(mod.split, ~Lavorazione:Diserbo)
## Note: re-fitting model with sum-to-zero contrasts
medieA; medieB; medieAB
##   Lavorazione emmean      SE df lower.CL upper.CL
##   MIN          7.49 0.276   6      6.81      8.16
```

```

## PROF          9.92 0.276  6      9.24    10.59
## SUP           8.81 0.276  6      8.13     9.48
##
## Results are averaged over the levels of: Blocco, Diserbo
## Warning: EMMs are biased unless design is perfectly balanced
## Confidence level used: 0.95
## Diserbo emmean    SE    df lower.CL upper.CL
## parz          8.37 0.372 12.6      7.56     9.17
## tot           9.11 0.372 12.6      8.30     9.92
##
## Results are averaged over the levels of: Blocco, Lavorazione
## Warning: EMMs are biased unless design is perfectly balanced
## Confidence level used: 0.95
## Lavorazione Diserbo emmean    SE    df lower.CL
## MIN          parz          6.00 0.644 12.6      4.60
## PROF          parz         10.63 0.644 12.6      9.23
## SUP           parz          8.48 0.644 12.6      7.08
## MIN          tot          8.98 0.644 12.6      7.59
## PROF          tot          9.21 0.644 12.6      7.81
## SUP           tot          9.14 0.644 12.6      7.74
## upper.CL
##          7.39
##         12.03
##          9.87
##         10.38
##         10.60
##         10.54
##
## Results are averaged over the levels of: Blocco
## Warning: EMMs are biased unless design is perfectly balanced
## Confidence level used: 0.95

```

Gli errori standard si calcolano in modo più complicato che non nel caso dell'ANOVA fattoriale semplice. Infatti, oltre che al numero di repliche degli effetti in gioco, è necessario fare attenzione alla scelta della voce d'errore. In generale, il calcolo degli errori standard non è banale, in quanto dobbiamo tener presenti le componenti di varianza che agiscono su ogni strato di errore. Le formule da impiegare sono riportate più sotto;  $A$  è il fattore principale (lavorazione),  $B$  il fattore secondario (diserbo),  $r$  il numero di repliche,  $a$  il numero di livelli di  $A$  e  $b$  il numero di livelli di  $B$ ,  $MSE(1)$  è l'errore delle main-plots ed  $MSE(2)$  è il residuo:



$$SEM_A = \sqrt{\frac{MSE(1)}{rb}} = \sqrt{\frac{0.61}{4 \times 2}} = 0.276$$

$$SEM_B = \sqrt{\frac{(b-1)MSE(2) + MSE(1)}{rab}} = \sqrt{\frac{(2-1) \times 2.711 + 0.61}{4 \times 3 \times 2}} = 0.372$$

$$SEM_{A:B} = \sqrt{\frac{[(b-1)MSE(2) + MSE(1)]}{rb}} = \sqrt{\frac{(2-1) \times 2.711 + 0.61}{4 \times 2}} = 0.644$$

I SEMs vengono utilizzati come misura di variabilità per le medie del primo fattore sperimentale, del secondo fattore sperimentale e delle combinazioni tra i due fattori sperimentali.

Bisogna tener presente che, a parte il fattore sperimentale di primo livello, per le altre medie i SEM sono costruiti operando una combinazione lineare di varianze. Pertanto, il numero di gradi di libertà potrà essere solo approssimato, come vedremo in seguito.

### 16.1.6 SED e confronti multipli

Nei disegni a split-plot abbiamo 4 tipi di differenze tra medie.

1. Differenze tra due medie del fattore principale A (per esempio tra MIN - SUP)
2. Differenze tra due medie del fattore B (TOT - PARZ)
3. Differenze tra due medie del fattore B per lo stesso livello di A (MIN:TOT - MIN:PARZ). Per questa situazione si parla di differenze tra B entro A, che si abbrevia B|A.
4. Differenze tra due medie del fattore B per un diverso livello di A (MIN:TOT - SUP:PARZ). In questo caso l'abbreviazione è B:A.

Per ognuna di queste differenze vi è una voce di errore (Errore standard della differenza = SED), ottenuto con il termine appropriato nell'ANOVA.

$$SED_A = \sqrt{\frac{2 \times MSE(1)}{rb}}$$

$$SED_B = \sqrt{\frac{2 \times MSE(2)}{ra}}$$

$$SED_{B|A} = \sqrt{\frac{2 \times MSE(2)}{r}}$$

$$SED_{A:B} = \sqrt{\frac{2[(b-1)MSE(2) + MSE(1)]}{rb}}$$

In questo caso, l'unico effetto significativo è quello relativo alla 'lavorazione', con un SED pari a:

$$SED_{LAV} = \sqrt{\frac{2 \times 0.6097}{4 \times 2}} = 0.3904$$

I SED sono utili per i test di confronto multiplo, che, tuttavia, possono essere eseguiti, come usuale, con R. In questo caso, solo l'effetto lavorazione è significativo, quindi operiamo il confronto multiplo per questo effetto.

```
multcomp::cld(medieA, Letters = LETTERS)
## Lavorazione emmean    SE df lower.CL upper.CL .group
## MIN                7.49 0.276  6      6.81    8.16    A
## SUP                8.81 0.276  6      8.13    9.48    B
## PROF               9.92 0.276  6      9.24   10.59    B
##
## Results are averaged over the levels of: Blocco, Diserbo
## Warning: EMMs are biased unless design is perfectly balanced
## Confidence level used: 0.95
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
## significance level used: alpha = 0.05
```

Un aspetto da considerare, qualora l'interazione 'A:B' fosse significativa, è che se vogliamo confrontare tra di loro combinazioni in cui i livelli di A sono diversi (ad esempio la media ottenuta con le lavorazioni superficiali e il diserbo totale con quella ottenuta con la lavorazione profonda e il diserbo totale), dobbiamo tener presente che sono coinvolti entrambi gli strati di errore (vedi le formule più sopra). In questo caso il SED è costruito come combinazione lineare di  $MSE(1)$  ed  $MSE(2)$  e il calcolo dei suoi gradi di libertà non è banale. In questo esempio, il SED è:

$$SED_{A:B} = \sqrt{2 \times \frac{(2-1) \times 2.711 + 0.6097}{4 \times 2}}$$

La combinazione lineare tra varianze è della forma:

$$M = \alpha_1 MS(1) + \alpha_2 MS(2) = (2-1) \times 2.711 + 1 \times 0.6097$$

ed il numero di gradi di libertà per M (da utilizzare nel confronto multiplo) si può ottenere con l'approssimazione di Satterthwaite:

$$df_M = \frac{M^2}{\sum_{i=1}^n \frac{(\alpha_i MS_i)^2}{df_i}} = \frac{11.6097}{\frac{(2-1) \times 2.711}{6} + \frac{0.6097}{9}} = 12.554$$

dove df sta per ‘degrees of freedom’ (gradi di libertà) relativi ad ognuna delle varianze in gioco.

```
multcomp::cld(medieAB, Letters = LETTERS)
## Lavorazione Diserbo emmean    SE    df lower.CL
## MIN      parz      6.00 0.644 12.6      4.60
## SUP      parz      8.48 0.644 12.6      7.08
## MIN      tot       8.98 0.644 12.6      7.59
## SUP      tot       9.14 0.644 12.6      7.74
## PROF      tot       9.21 0.644 12.6      7.81
## PROF      parz     10.63 0.644 12.6      9.23
## upper.CL .group
##      7.39  A
##      9.87  AB
##     10.38  AB
##     10.54  B
##     10.60  B
##     12.03  B
##
## Results are averaged over the levels of: Blocco
## Warning: EMMs are biased unless design is perfectly balanced
## Confidence level used: 0.95
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 6 estimates
## significance level used: alpha = 0.05
```

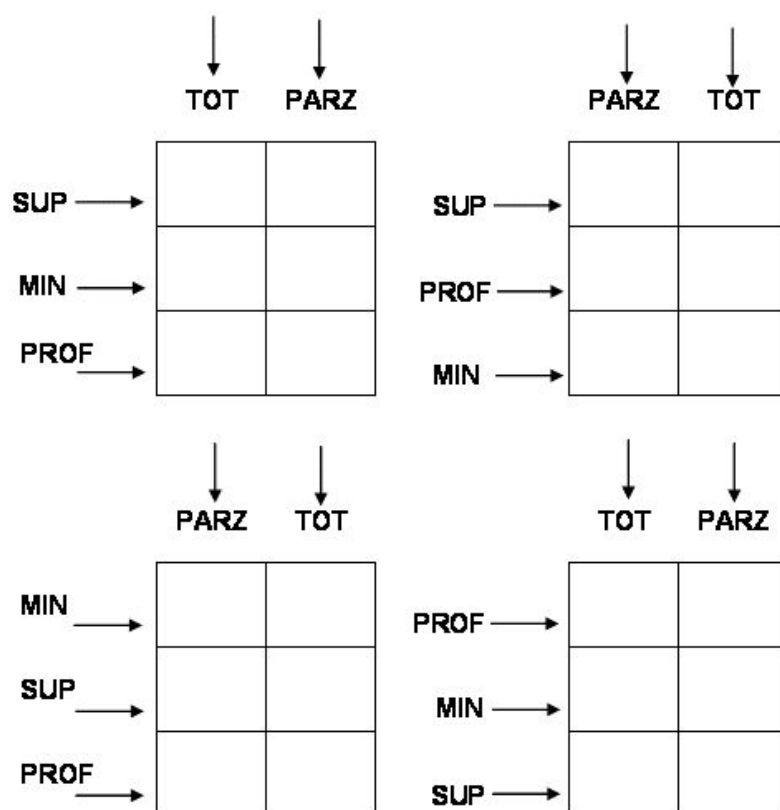


Figura 16.2: Esempio di un disegno a strip-plot per il dataset 'beet.csv', che prevede tre livelli di lavorazione e due livelli di diserbo chimico

## 16.2 Disegni a split-block

In alcune circostanze, soprattutto nelle prove di diserbo chimico, potrebbe trovare applicazione un altro tipo di schema sperimentale, nel quale ogni blocco viene diviso in tante righe quanti sono i livelli di un fattore sperimentale e tante colonne quanti sono i livelli dell'altro. In questo modo, il primo trattamento sperimentale viene applicato a tutte le parcelle di una riga e l'altro trattamento a tutte le parcelle di una colonna. Ovviamente, l'allocatione alle righe e alle colonne è casuale e cambia in ogni blocco.

Questo disegno è detto **strip-plot** ed è molto comodo perché consente di lavorare velocemente. Se consideriamo il caso studio precedente, un disegno a strip-plot potrebbe essere immaginato come in Figura 16.2.

### 16.2.1 Definizione del modello lineare

Dalla mappa si può osservare che, entro ogni blocco, le osservazioni sono raggruppate per riga e per colonna. Di conseguenza, anche le righe e le colonne debbono essere incluse nel modello lineare, per ripristinare l'indipendenza dei residui. Il modello è quindi:

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_k + \alpha_i + \theta_{ik} + \beta_j + \zeta_{jk} + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Analogamente a quanto abbiamo visto per lo split-plot, le 12 righe sono univocamente definite da un livello di lavorazione e un blocco e, per questo, l'effetto  $\theta$  porta i pedici  $i$  e  $k$ . D'altra parte, le 8 colonne sono definite da un livello di diserbo e un blocco, per cui l'effetto  $\zeta$  porta i pedici  $j$  e  $k$ . Entrambi gli effetti sono da considerare random, per cui anche questo è un modello 'misto', con tre effetti random.

### 16.2.2 Scomposizione della varianza

L'effetto delle righe e delle colonne può essere stimato come l'effetto delle main-plots nel disegno a split-plot. Per i test F, dobbiamo considerare che, per entrambi i fattori sperimentali, il disegno può essere assimilato ad un blocco randomizzato e, di conseguenza, l'effetto delle lavorazioni dovrebbe essere saggiato sull'effetto delle righe, mentre l'effetto del diserbo su quello delle colonne.

Per la scomposizione della varianza utilizziamo R e la funzione 'aov()', con il codice è esposto di seguito; come nel caso precedente, è opportuno creare una variabile aggiuntiva che, in questo caso, codifica per le main-plots relative al diserbo chimico.

```
mainPlot2 <- with(dataset, factor(Blocco):factor(Diserbo))
model.strip <- aov(Prod ~ factor(Blocco) + Lavorazione*Diserbo +
  Error(mainPlot + mainPlot2), data = dataset)
## Warning in aov(Prod ~ factor(Blocco) + Lavorazione *
## Diserbo + Error(mainPlot + : Error() model is singular
anova(model.strip)
##
## Error: mainPlot
##
##          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## factor(Blocco) 3  3.660    1.22    2.001 0.2155
## Lavorazione    2 23.656   11.83   19.399 0.0024 **
```

```
## Residuals      6  3.658    0.61
## ---
## Signif. codes:
## 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Error: mainPlot2
##           Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Diserbo    1   3.32    3.32   0.988  0.393
## Residuals   3  10.08    3.36
##
## Error: Within
##           Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Lavorazione:Diserbo  2  19.46   9.732   4.077 0.0762 .
## Residuals           6  14.32   2.387
## ---
## Signif. codes:
## 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

## SED e confronti multipli

Si opera nel modo usuale. In questa sede, come riferimento, riportiamo solo le formule per il calcolo dei SED.

$$SED_A = \sqrt{2 \times \frac{MSE(1)}{rb}}$$

$$SED_B = \sqrt{2 \times \frac{MSE(2)}{ra}}$$

$$SED_{A|B} = \sqrt{2 \times \frac{(b-1)MSE(3) + MSE(1)}{rb}}$$

$$SED_{B|A} = \sqrt{2 \times \frac{(a-1)MSE(3) + MSE(2)}{ra}}$$

$$SED_{A:B} = \sqrt{2 \times \frac{(ab-a-b)MSE(3) + bMSE(2) + aMSE(1)}{rab}}$$

## 16.3 Disegni gerarchici

Nel capitolo 11 (e negli esempi sovrastanti) abbiamo presentato un esperimento fattoriale ‘incrociato’ (crossed), nel quale i livelli di A sono gli stessi per ogni livello di B (e viceversa). In alcune situazioni, i disegni fattoriali possono essere gerarchici (nested), cioè i livelli di un fattore cambiano al cambiare dei livelli dell’altro fattore.

Ad esempio, potremmo prendere tre linee pure impollinanti di mais (A1, A2 e A3) e incrociarle con tre linee portaseme, diverse per ogni linea impollinante (B1, B2 e B3 incrociate con A1, B4, B5 e B6 incrociate con A2 e B7, B8 e B9 incrociate con A3). In questo modo verremmo a misurare le produzioni di 9 ibridi, divisi in tre gruppi, in base alle linee impollinanti. Se immaginiamo di impiantare in campo un esperimento del genere, utilizzando uno schema a blocchi randomizzati con quattro repliche, alla fine ci troviamo con 36 dati, come quelli riportati nel dataset ‘Crosses.csv’, che è disponibile su [gitHub](#), e al solito, può essere caricato con il codice indicato di seguito.

```
path1 <- "https://raw.githubusercontent.com/OnofriAndreaPG/"
path2 <- "aomisc/master/data/"
name <- "Crosses.csv"
pathName <- paste(path1, path2, name, sep = "")
dataset <- read.csv(pathName, header=T)
head(dataset, 15)
```

##	Male	Female	Block	Yield
## 1	A1	B1	1	9.984718
## 2	A1	B1	2	13.932663
## 3	A1	B1	3	12.201312
## 4	A1	B1	4	1.916661
## 5	A1	B2	1	8.928465
## 6	A1	B2	2	10.513908
## 7	A1	B2	3	10.035964
## 8	A1	B2	4	2.375822
## 9	A1	B3	1	21.511028
## 10	A1	B3	2	21.859852
## 11	A1	B3	3	17.626284
## 12	A1	B3	4	13.966646
## 13	A2	B4	1	17.483089
## 14	A2	B4	2	19.480893
## 15	A2	B4	3	12.838792

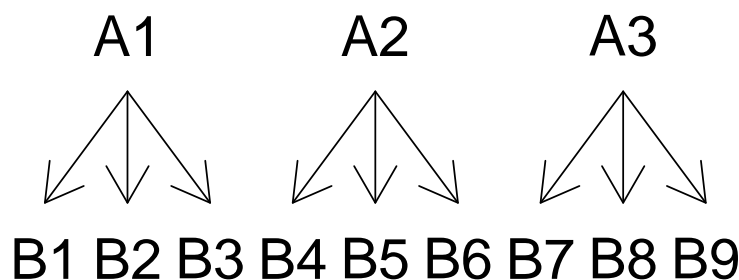


Figura 16.3: Struttura di un disegno sperimentale gerarchico

### 16.3.1 Definizione di un modello lineare

In un esperimento simile, abbiamo un effetto blocco ( $\gamma$ ) e un effetto ‘paterno’ ( $\alpha$ ). Invece, l’effetto ‘materno’ ( $\delta$ ) può essere individuato solo entro ogni linea impollinante, dato che le linee portaseme sono diverse per ogni linea impollinante. In altre parole, l’effetto ‘materno’ è gerarchicamente inferiore all’effetto ‘paterno’, come evidenziato nella Figura 16.3.

Per descrivere il meccanismo di generazione delle osservazioni, possiamo utilizzare questo modello:

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_k + \alpha_i + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

dove  $\gamma_k$  è l’effetto del blocco (con  $k$  che va da 1 a 4),  $\alpha_i$  è l’effetto dell’impollinante (con  $i$  che va da 1 a 3) e  $\delta_{ij}$  è l’effetto del portaseme (con  $j$  che va da 1 a 9) entro ogni impollinante  $i$ . Ancora,  $\varepsilon$  è il residuo, assunto normalmente distribuito, con media zero e deviazione standard  $\sigma$  (omoscedasticità). Vediamo subito la principale differenza con un disegno fattoriale incrociato: mentre per quest’ultimo disegno il modello contiene i due fattori sperimentali A e B, insieme all’interazione A:B, nel modello per un disegno innestato abbiamo solo il fattore A ed il fattore B entro A (abbreviato come A/B), mentre manca l’effetto principale B, che, di fatto, non può esistere.

### 16.3.2 Stima dei parametri

Per la stima dei parametri, utilizziamo R ed il metodo dei minimi quadrati, attraverso l’ormai usuale funzione ‘lm()’.

```
model <- lm(Yield ~ factor(Block) + Male + Male:Female, data = dataset)
summary(model)
```



CAPITOLO 16. APPENDICE 3: SPLIT-PLOT, SPLIT-BLOCK E ALTRO280

```
##
## Call:
## lm(formula = Yield ~ factor(Block) + Male + Male:Female, data = dataset)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.95836 -1.14888  0.04749  1.08992  2.64592
##
## Coefficients: (18 not defined because of singularities)
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)    11.3625     0.9805  11.589 2.56e-11
## factor(Block)2     1.1476     0.8005   1.434  0.1646
## factor(Block)3    -1.2472     0.8005  -1.558  0.1323
## factor(Block)4    -7.3151     0.8005  -9.138 2.78e-09
## MaleA2           -0.7878     1.2008  -0.656  0.5180
## MaleA3            0.5975     1.2008   0.498  0.6233
## MaleA1:FemaleB2  -1.5453     1.2008  -1.287  0.2104
## MaleA2:FemaleB2         NA         NA      NA      NA
## MaleA3:FemaleB2         NA         NA      NA      NA
## MaleA1:FemaleB3   9.2321     1.2008   7.688 6.33e-08
## MaleA2:FemaleB3         NA         NA      NA      NA
## MaleA3:FemaleB3         NA         NA      NA      NA
## MaleA1:FemaleB4         NA         NA      NA      NA
## MaleA2:FemaleB4   6.4599     1.2008   5.380 1.59e-05
## MaleA3:FemaleB4         NA         NA      NA      NA
## MaleA1:FemaleB5         NA         NA      NA      NA
## MaleA2:FemaleB5   2.5073     1.2008   2.088  0.0476
## MaleA3:FemaleB5         NA         NA      NA      NA
## MaleA1:FemaleB6         NA         NA      NA      NA
## MaleA2:FemaleB6         NA         NA      NA      NA
## MaleA3:FemaleB6         NA         NA      NA      NA
## MaleA1:FemaleB7         NA         NA      NA      NA
## MaleA2:FemaleB7         NA         NA      NA      NA
## MaleA3:FemaleB7  10.0089     1.2008   8.335 1.52e-08
## MaleA1:FemaleB8         NA         NA      NA      NA
## MaleA2:FemaleB8         NA         NA      NA      NA
## MaleA3:FemaleB8   7.6209     1.2008   6.346 1.46e-06
## MaleA1:FemaleB9         NA         NA      NA      NA
## MaleA2:FemaleB9         NA         NA      NA      NA
## MaleA3:FemaleB9         NA         NA      NA      NA
##
## (Intercept)      ***
## factor(Block)2
```

```

## factor(Block)3
## factor(Block)4 ***
## MaleA2
## MaleA3
## MaleA1:FemaleB2
## MaleA2:FemaleB2
## MaleA3:FemaleB2
## MaleA1:FemaleB3 ***
## MaleA2:FemaleB3
## MaleA3:FemaleB3
## MaleA1:FemaleB4
## MaleA2:FemaleB4 ***
## MaleA3:FemaleB4
## MaleA1:FemaleB5
## MaleA2:FemaleB5 *
## MaleA3:FemaleB5
## MaleA1:FemaleB6
## MaleA2:FemaleB6
## MaleA3:FemaleB6
## MaleA1:FemaleB7
## MaleA2:FemaleB7
## MaleA3:FemaleB7 ***
## MaleA1:FemaleB8
## MaleA2:FemaleB8
## MaleA3:FemaleB8 ***
## MaleA1:FemaleB9
## MaleA2:FemaleB9
## MaleA3:FemaleB9
## ---
## Signif. codes:
## 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 1.698 on 24 degrees of freedom
## Multiple R-squared: 0.9405, Adjusted R-squared: 0.9132
## F-statistic: 34.48 on 11 and 24 DF, p-value: 5.236e-12

```

Per chi volesse comprendere l'output ottenuto e il significato biologico dei parametri, ricordiamo che R impiega, di default, il vincolo sul trattamento. Di conseguenza,  $\alpha_1 = 0$  e  $\delta_{11} = 0$ . Inoltre, visto che l'effetto materno deve essere definito per ogni impollinante, è necessario vincolare un valore di  $\delta$  per ogni impollinante. Da questo punto di vista, la soluzione adottata da R non è molto intuitiva, in quanto questo software vincola l'ultimo livello di B per ogni livello di A; quindi pone i vincoli  $\delta_{26} = 0$  e  $\delta_{39} = 0$ .

Con questi vincoli,  $\mu$  è il valore atteso per l'ibrido ottenuto dal primo impollinante, primo portaseme (A1B1) nel primo blocco. I parametri  $\gamma_k$  sono ottenuti analogamente a quanto illustrato nel capitolo sull'ANOVA fattoriale. Invece, i parametri  $\alpha_i$  debbono essere ottenuti in modo diverso, in quanto non possiamo cambiare l'impollinante mantenendo costante il portaseme. Possiamo notare che:

$$\bar{Y}_{111} = \mu + \alpha_1 + \delta_{11} = \mu$$

e (per il vincolo imposto):

$$\bar{Y}_{261} = \mu + \alpha_2 + \delta_{26} = \mu + \alpha_2$$

Quindi:

$$\alpha_2 = \bar{Y}_{261} - \bar{Y}_{111}$$

e, analogamente:

$$\alpha_3 = \bar{Y}_{291} - \bar{Y}_{111}$$

La stima di  $\delta_{ij}$  è più semplice, basta notare, ad esempio, che

$$\bar{Y}_{121} = \mu + \alpha_1 + \delta_{12} = \mu + \delta_{12}$$

Quindi:

$$\delta_{12} = \bar{Y}_{121} - \bar{Y}_{111}$$

e così via, per tutti gli altri parametri.

### 16.3.3 Scomposizione della varianza

Per suddividere la devianza totale delle osservazioni nelle quote che competono ad ogni effetto, utilizziamo il solito metodo sequenziale. La devianza totale è ottenuto da un modello nullo, calcolando la somma dei quadrati degli scarti:

```
modNull <- lm(Yield ~ 1, data = dataset)
TSS <- sum(residuals(modNull)^2)
TSS
## [1] 1162.882
```

Inseriamo ora il blocco, calcoliamo la devianza del residuo e, per sottrazione, otteniamo la devianza del blocco

```
modBl <- lm(Yield ~ factor(Block), data = dataset)
BlSS <- TSS - sum(residuals(modBl)^2)
BlSS
## [1] 383.7506
```

Successivamente, inseriamo gli altri effetti, nello stesso modo.

```
modA <- lm(Yield ~ factor(Block) + Male, data = dataset)
ASS <- TSS - BlSS - sum(residuals(modA)^2)
ASS
## [1] 134.7567
BSS <- TSS - BlSS - ASS - sum(residuals(model)^2)
BSS
## [1] 575.1607
```

I gradi di libertà, per gli effetti immessi in sequenza, sono, rispettivamente, 3 (abbiamo quattro blocchi), 2 (abbiamo tre ‘parentali’) e 6 (abbiamo calcolato gli scostamenti rispetto alle medie degli impollinanti: quindi abbiamo, 2 gradi di libertà per ogni impollinante).

Più facilmente, arriviamo agli stessi risultati con la funzione ‘anova()’, in R:

```
anova(model)
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Yield
##           Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## factor(Block)  3 383.75  127.917   44.355 6.051e-10 ***
## Male           2  134.76   67.378   23.363 2.331e-06 ***
## Male:Female    6 575.16   95.860   33.239 1.742e-10 ***
## Residuals     24   69.21    2.884
## ---
## Signif. codes:
## 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

### 16.3.4 Medie e SEM

Il calcolo delle medie è banale, così come il calcolo degli errori standard. Dobbiamo solo ricordare che, per ogni parentale, vi sono 12 repliche (4 blocchi per 3 portaseme). Quindi

```
sqrt( summary(model)$sigma^2 / 12 )
## [1] 0.4902317
```

$$SEM_A = \sqrt{\frac{MSE}{rb}} = \sqrt{\frac{2.079}{4 \times 3}} = 0.416$$

Al contrario, per ognuno dei 9 portaseme abbiamo 4 repliche

$$SEM_B = \sqrt{\frac{MSE}{r}} = \sqrt{\frac{2.079}{4}} = 0.721$$

Più in generale, possiamo calcolare le medie marginali attese con la funzione ‘emmeans()’

```
library(emmeans)
medie <- emmeans(model, ~Male)
medie
## Male emmean SE df lower.CL upper.CL
## A1 12.1 0.49 24 11.1 13.1
## A2 11.7 0.49 24 10.7 12.7
## A3 16.0 0.49 24 15.0 17.0
##
## Results are averaged over the levels of: Block, Female
## Confidence level used: 0.95

library(emmeans)
medie <- emmeans(model, ~Male:Female)
medie
## Female Male emmean SE df lower.CL upper.CL
## B1 A1 9.51 0.849 24 7.76 11.26
## B2 A1 7.96 0.849 24 6.21 9.72
## B3 A1 18.74 0.849 24 16.99 20.49
## B4 A2 15.18 0.849 24 13.43 16.93
## B5 A2 11.23 0.849 24 9.48 12.98
## B6 A2 8.72 0.849 24 6.97 10.47
## B7 A3 20.12 0.849 24 18.36 21.87
## B8 A3 17.73 0.849 24 15.97 19.48
```

```
## B9      A3      10.11 0.849 24      8.35      11.86
##
## Results are averaged over the levels of: Block
## Confidence level used: 0.95
```

Se necessario, contrasti e confronti multipli possono essere eseguiti come usuale.

Volevo concludere precisando che, specificatamente per questo esempio, un *plant breeder* potrebbe non essere interessato a valutare la significatività degli effetti con il test F o ad effettuare confronti tra le medie, ma potrebbe essere più interessato a valutare la variabilità delle produzioni legata alle linee materne e/o paterne, per ottenere alcuni indicatori noti come ‘componenti di varianza’, che sono fondamentali per studiare l’ereditabilità dei caratteri. Di conseguenza, per un *plant breeder*, la tabella ANOVA non è il punto di arrivo, ma solo il punto di partenza per altre valutazioni. Per questo rimandiamo alla letteratura specialistica.