

# Esperimenti in vaso: disegni a randomizzazione completa

Andrea Onofri

10 marzo 2015

## Indice

<b>1</b>	<b>Disegno sperimentale</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Analisi dei dati</b>	<b>3</b>
2.1	Analisi della varianza (ANOVA) . . . . .	4
2.2	Errore sperimentale medio . . . . .	7

### Sommario

Scopo di questo documento è illustrare come vengono pianificati, organizzati gli esperimenti a randomizzazione completa. Viene inoltre illustrato come si può facilmente eseguire l'elaborazione statistica dei dati sperimentali, evitando gli errori più comuni.

# 1 Disegno sperimentale

## Background scientifico

- *Solanum nigrum* è un'infestante molto difficile da controllare nella coltura del pomodoro.
- Metribuzin e rimsulfuron sono due erbicidi che vengono utilizzati nel pomodoro, ma nessuno dei due è efficace verso questa specie infestante.
- Alcune informazioni di letteratura e il meccanismo di azione di questi erbicidi suggeriscono che, se essi venissero utilizzati in miscela, potrebbero manifestare un effetto sinergico verso questa importante erba infestante.

## Ipotesi scientifica, obiettivi e motivazioni

- L'ipotesi scientifica di base è che rimsulfuron e metribuzin possano manifestare un effetto sinergico, che incrementi l'efficacia della miscela rispetto ai due componenti utilizzati separatamente
- L'obiettivo della ricerca è quello di verificare l'esistenza di questo effetto sinergico
- Il motivo fondamentale che consiglia questo studio è che gli agricoltori potrebbero ritrarre un notevole beneficio se avessero la disponibilità di una soluzione efficace per eliminare il *Solanum nigrum* dalle colture di pomodoro.

## Materiali e metodi

- Esperimento in vaso
- Tre trattamenti sperimentali: metribuzin (Dose in Etichetta: DE), rimsulfuron (DE), metribuzin + rimsulfuron (DE+DE)
- Come riferimento, aggiungiamo un controllo non trattato
- Seminiamo *Solanum nigrum* in 16 vasi, il più omogenei possibile
- Ad ogni vaso è assegnato casualmente un trattamento, con 4 repliche
- Le unità sperimentali e l'ambiente sono molto omogenei e pertanto non viene effettuato nessun tipo di 'blocking'.
- i vasetti sono disposti casualmente sui bancali di una serra
- Allo stadio di quattro foglie vere, i vaso vengono trattati con uno spruzzatore adeguato, in modo indipendente l'uno dall'altro.

Una possibile disposizione dei vasetti è riportata nella figura sottostante.

### Disegno sperimentale (mappa)

<b>D</b> 13	<b>C</b> 14	<b>A</b> 15	<b>B</b> 16
<b>B</b> 9	<b>B</b> 10	<b>D</b> 11	<b>A</b> 12
<b>C</b> 5	<b>D</b> 6	<b>A</b> 7	<b>B</b> 8
<b>A</b> 1	<b>C</b> 2	<b>D</b> 3	<b>C</b> 4

### Rilievi

- Tre settimane dopo il trattamento, viene prelevata la vegetazione infestante presente su ogni vasetto.
- La biomassa viene seccata a 105°C per 48 ore e viene pesata.

## 2 Analisi dei dati

### Preparazione del data file

Pot	Tesi	rep	Weight
1	Unweeded	1	24.62
8	Unweeded	2	30.94
11	Unweeded	3	24.02
15	Unweeded	4	27.51
3	Metribuzin 348	1	15.2
5	Metribuzin 348	2	4.38
9	Metribuzin 348	3	10.32
14	Metribuzin 348	4	6.8
2	Mixture 378	1	6.14
7	Mixture 378	2	1.95
10	Mixture 378	3	7.27
16	Mixture 378	4	5.15
4	Rimsulfuron 30	1	10.5
6	Rimsulfuron 30	2	20.7
12	Rimsulfuron 30	3	20.74
13	Rimsulfuron 30	4	15.5

Il datafile è preparato come un database, nel quale ogni riga contraddistingue un'unità sperimentale (record) e ogni colonna rappresenta una caratteristica del record (campo).

### Quali analisi effettuare

- Calcolare le medie per ogni tesi sperimentale
- Eseguire l'ANOVA
- Calcolare l'errore sperimentale medio (SEM)
- Eseguire un test di confronto multiplo (solo con fattori sperimentali qualitativi)
- Eseguire l'analisi di regressione (solo con fattori sperimentali quantitativi. Ne parleremo in seguito!)

### Statistica descrittiva

Tesi	Media	Dev. st.
Metribuzin 348	9.18	4.70
Mixture 378	5.13	2.29
Rimsulfuron 30	16.86	4.90
Unweeded	26.77	3.17

1. Che cosa ci dice questa tabella, in base agli obiettivi?
2. La miscela sembra più efficace dei prodotti singoli
3. Esiste una certa variabilità (errore sperimentale), che impedisce un giudizio definitivo

### 2.1 Analisi della varianza (ANOVA)

Per il calcolo dell'ANOVA, in questo semplice esempio possiamo procedere nel modo seguente:

1. Calcolo media generale
2. Calcolo delle medie dei trattamenti
3. Calcolo degli effetti dei trattamenti
4. Calcolo del 'residuo'
5. test F

1 - CALCOLO DELLE MEDIE. E' banale calcolare la media generale, pari a 14.48. Le medie dei trattamenti si calcolano in modo altrettanto banale e sono riportate più sopra.

2 - EFFETTO DEL TRATTAMENTO. Basta considerare che se non vi fosse variabilità di nessun tipo (né trattamento né errore) tutti i dati sarebbero uguali alla media generale. Imponendo diversi trattamenti provochiamo invece uno spostamento della media di ciascun trattamento rispetto alla media generale. Di conseguenza, l'effetto del trattamento (alla seconda cifra decimale) è pari alla differenza tra la media del trattamento e la media generale.

Trattamento	Media tratt.	Media gen.	Effetto trattamento
Unweeded	26.77	14.48	12.29
Metribuzin 348	9.18	14.48	-5.30
Mixture 378	5.13	14.48	-9.35
Rimsulfuron 30	16.86	14.48	2.38

Possiamo quindi calcolare la devianza del trattamento facendo la somma degli 'effetti' al quadrato:

$$SS_t = (12.29)^2 + (-5.30)^2 + (-9.35)^2 + (2.38)^2 = 272.221$$

Dato che abbiamo quattro repliche, la devianza appena calcolata deve essere moltiplicata per quattro

$$272.221 \times 4 = 1088.88$$

Questa quantità ha tre gradi di libertà (numero dei trattamenti - 1) e quindi la relativa varianza è:

$$MS_t = \frac{1088.88}{3} = 362.96$$

3 - ERRORE SPERIMENTALE (RESIDUO). L'errore sperimentale è quello che fa sì che ogni dato sia diverso dalla media del trattamento a cui appartiene (e cioè la variabilità espressa dalle osservazioni che hanno lo stesso trattamento). Possiamo calcolare quindi i residui come differenza tra il dato osservato in ogni parcella e la media del trattamento a cui quella parcella appartiene:

Tesi	Weight	Medie	Residui	Residui <sup>2</sup>
Unweeded	24.62	26.77	-2.15	4.622
Unweeded	30.94	26.77	4.17	17.389
Unweeded	24.02	26.77	-2.75	7.563
Unweeded	27.51	26.77	0.74	0.548
Metribuzin 348	15.2	9.18	6.02	36.240
Metribuzin 348	4.38	9.18	-4.80	23.040
Metribuzin 348	10.32	9.18	1.14	1.300
Metribuzin 348	6.8	9.18	-2.38	5.664
Mixture 378	6.14	5.13	1.01	1.020
Mixture 378	1.95	5.13	-3.18	10.112
Mixture 378	7.27	5.13	2.14	4.580
Mixture 378	5.15	5.13	0.02	0.001
Rimsulfuron 30	10.5	16.86	-6.36	40.450
Rimsulfuron 30	20.7	16.86	3.84	14.746
Rimsulfuron 30	20.74	16.86	3.88	15.054
Rimsulfuron 30	15.5	16.86	-1.36	1.850

I residui esprimono la variabilità non spiegata e la somma dei loro quadrati costituisce la devianza del residuo (errore sperimentale), pari a 184.178

I residui anzidetti costituiscono lo scostamento di ogni dato rispetto alla media del trattamento e, di conseguenza, per ogni trattamento la loro somma deve essere 0. Quindi per ogni trattamento vi sono 3 gradi di libertà e, di conseguenza,

il numero di gradi di libertà dell'errore è pari a 12 (3 x il numero dei trattamenti).  
 Ne consegue che la varianza dell'errore è pari a:

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

4 - TEST F. In statistica, come nei tribunali, si assume che l'imputato (in questo caso l'effetto del trattamento) non ha commesso il fatto (non è stato efficace) fino a prova contraria. Quest'ultima viene espressa attraverso il rapporto tra la varianza del trattamento e quella dell'errore:

$$F = \frac{MS_t}{MS_e} = \frac{362.96}{15.348} = 23.65$$

E' evidente che se il trattamento non fosse stato efficace non dovrebbe aver prodotto una variabilità superiore a quella dell'errore (quindi  $F = 1$ ). In questo caso la variabilità prodotta dal trattamento è stata quasi 24 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.

Il calcolo di probabilità ci insegna a determinare quante possibilità ci sono che, in assenza di un effetto del trattamento (quindi per il solo effetto del caso), si produca un valore di F pari a 23.65. Utilizzando un qualunque foglio elettronico possiamo scoprire che questa probabilità è di  $2.510^{-5}$ , il che implica che, 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. Arbitrariamente, si considera accettabile un rischio di errore del 5%, quindi in questo caso rifiutiamo l'ipotesi nulla ed accettiamo quella alternativa.

INSOMMA:

## ANOVA

- Con l'ANOVA la variabilità totale dei dati viene decomposta in due quote, una attribuibile al trattamento sperimentale ed una inspiegabile (residuo)
- L'effetto del trattamento è significativo, se la variabilità che esso provoca è superiore a quella inspiegabile
- Confronto tra varianze (test F). L'ipotesi nulla è che il trattamento NON E' significativo
- P rappresenta la probabilità di errore nel rifiutare l'ipotesi nulla
- L'ipotesi nulla è rifiutata quando  $P \leq 0.05$  (livello di protezione arbitrario, ma universalmente accettato)

## Tabella ANOVA

EFFECT	SS	DF	MS	F	ProbF	Sign. F
Tesi	1088.88	3	362.96	23.65	$2.510^{-5}$	* *
Residual	184.178	12	15.348			

- F è il rapporto tra la varianza del trattamento e quella del residuo
- L'effetto del trattamento è significativo (prob. errore =  $2.510^{-5}$ )
- Per visualizzare meglio la significatività si usano gli asterischi (\* =  $0.01 \leq P \leq 0.05$ ; \*\* =  $P \leq 0.01$ )

## 2.2 Errore sperimentale medio

Abbiamo visto che la varianza d'errore è pari a 15.348 e pertiene ad ogni singola osservazione effettuata durante l'esperimento. Potremmo però chiederci quale è la variabilità attesa per una media, che, in questo caso, è composta da quattro dati. Per fare questo, ci aiutano due teoremi, che dimostrano che:

1 - Se ho alcune variabili casuali ognuna con la sua varianza, la somma di queste variabili casuali ha una varianza pari alla somma delle varianze.

2 - Se una variabile casuale ha varianza pari a  $\sigma^2$  e viene moltiplicata per un valore  $n$ , la varianza del prodotto è pari a  $n^2\sigma^2$ .

In questo caso, la media risulta dalla somma di 4 osservazioni, con varianza pari a 35.09 ciascuna. Di conseguenza la varianza della somma è pari a  $4 \times 15.348$ . Tuttavia, per calcolare la media, la somma dei dati viene divisa per il numero delle repliche  $e$ , di conseguenza, la varianza della somma deve essere divisa per il quadrato del numero delle repliche ( $n$ ). In generale quindi la varianza di una media è data da:

$$MS_{media} = \frac{nMS_e}{n^2} = \frac{MS_e}{n} = \frac{15.348}{4}$$

Più che la varianza di una media ci interessa in genere la sua deviazione standard, che ha la stessa unità di misura della media. La deviazione standard di una media prende il nome di errore standard (SEM) e, in questo caso, è pari a 1.96. Concludiamo che l'incertezza esistente intorno al valore di ciascuna media è pari a 1.96 grammi.

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:

$$MS_{media1-media2} = MS_{media1} + MS_{media1media2} = 2 \frac{MS_e}{n} = 2 \cdot \frac{15.348}{4}$$

Anche in questo caso, più che la varianza della differenza ci interessa la deviazione standard della differenza (SED), che è la radice quadrata della quantità anzidetta ed è pari a 2.77. Concludiamo quindi che l'incertezza esistente intorno al valore della differenza tra due medie è pari a 2.77 g.

INSOMMA

### Errore sperimentale medio

**Definition 1.**

$$SEM = \sqrt{\frac{MS_{res}}{n}}; \quad SED = \sqrt{2 \frac{MS_{res}}{n}}$$

- Invece che utilizzare le deviazioni standard di ogni media (vedi sopra) si può utilizzare come misura di variabilità della prova l'incertezza che vi è intorno a ciascuna media (SEM) o intorno a ciascuna differenza tra medie (SED).
- SEM e SED sono espresse nella stessa unità di misura dei dati (sono deviazioni standard).
- Tutte le considerazioni fatte finora sono valide se il dataset è conforme alle assunzioni di base per l'anova, cioè normalità dei residui e omogeneità delle varianze. Tutto questo resta da dimostrare in una prossima lezione.

**Further readings**

Kuehl, R. O., 2000. Design of experiments: statistical principles of research design and analysis. Duxbury Press (CHAPTER 2)