






Pérdida de colmenas de abejas africanizadas (*Apis mellifera*) con signos asociados a la enfermedad denominada “mal de mayo” en Pérez Zeledón, San José, Costa Rica

Loss of Africanized honeybee (*Apis mellifera*) colonies with signs associated with the disease known as “Mal de Mayo” in Pérez Zeledón, San José, Costa Rica

Perda de colmeias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) com sinais associados à doença denominada “Mal de Maio” em Pérez Zeledón, San José, Costa Rica

Rafael A. Calderón-Fallas¹✉, Luis A. Sánchez-Chaves², Johan Van Veen³, Fernando Ramírez-Arias⁴, Andrea Cordero-Sánchez⁵

- 1- Universidad Nacional, Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Programa de Patología Apícola: biología, detección y manejo integrado de enfermedades, Heredia, Costa Rica. rafael.calderon.fallas@una.cr  <https://orcid.org/0000-0002-6991-6899>
- 2- Universidad Nacional, Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Programa Integrado de Ecología y Polinización, Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: luis.sanchez.chaves@una.cr  <https://orcid.org/0000-0003-4903-8176>
- 3- Universidad Nacional, Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Programa Regional de Apicultura y Meliponicultura, Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: johan.vanveen.marinissen@una.cr  <https://orcid.org/0000-0001-9304-6742>
- 4- Universidad Nacional, Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Programa de Producción Apícola Sostenible: Manejo Integrado de Apiarios y Reinas Seleccionadas, Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: jose.ramirez.arias@una.cr  <https://orcid.org/0000-0001-5902-3512>
- 5- Ministerio de Agricultura y Ganadería, Región de Desarrollo Brunca, Agencia de Extensión Agropecuaria San Isidro, Pérez Zeledón, San José, Costa Rica. Correo electrónico: acordero@mag.go.cr  <https://orcid.org/0009-0006-9639-7277>

Recibido: 24 de julio de 2024 **Corregido:** 23 de octubre de 2025 **Aceptado:** 11 de noviembre de 2025

Resumen

En Costa Rica, se ha reportado una enfermedad de las abejas melíferas denominada “mal de mayo”, la cual ocasiona la pérdida de colmenas durante abril y mayo, en zonas como San Carlos y Pérez Zeledón. Se caracteriza por la presencia de larvas con una estructura en forma de saco lleno de líquido, con signos similares a los descritos para la enfermedad de origen viral cría sacciforme. Mediante diferentes ensayos se descartó la presencia de virus y se asoció con el consumo de polen de algún o algunos árboles o plantas que florecen durante su aparición. El presente estudio se realizó en un apiario de 10 colmenas de abejas africanizadas en Pérez Zeledón, San José, durante abril y mayo de 2024. Se seleccionaron cuatro colmenas, de las que se colectó un segmento de panal con cría afectada. En el laboratorio, se examinaron celdas con opérculos perforados, se removió la larva y se colocó en un plato de

✉ Correo electrónico para correspondencia: rafael.calderon.fallas@una.cr



Petri para su observación. Además, se estimó la cantidad de cría afectada en cada panal, se cuantificó la totalidad y estableció una proporción. El tipo de polen en larvas afectadas y panales se identificó mediante análisis palinológico. La presencia del “mal de mayo”, se registró a partir del 11 de abril en la mayoría de las colmenas del apiario. Al momento de revisar los panales (30 de abril), un 14.0 % de las larvas presentaron signos y al avanzar la enfermedad a niveles severos (1.5 meses después: 26 de mayo), se observó que, de 10 colmenas ocho se perdieron, mientras que una quedó reducida a un núcleo. Además, se determinó la presencia del ácaro *Varroa destructor* y del microsporidio *Nosema* spp. en niveles leves. Por lo anterior, se puede inferir que el “mal de mayo” ocasionó daños considerables, ya que se perdió el 80.0% de las colmenas que mostraron el cuadro clínico. El periodo de floración del árbol *Vochysia ferruginea* coincidió con el inicio, desarrollo y finalización de la enfermedad.

Palabras clave: Enfermedad “mal de mayo”, larvas, polen, abejas africanizadas.

Abstract

In Costa Rica, particularly in areas such as San Carlos and Pérez Zeledón, a honeybee disease known as “Mal de Mayo” has been reported, resulting in colony losses during April and May. This condition is characterized by larvae with a sac-like structure filled with liquid, exhibiting signs similar to those described for the Sacbrood viral disease. Using various tests, the presence of the virus was excluded, and the association was attributed to pollen from trees or plants in bloom at that time. This study was conducted in an apiary comprising 10 Africanized honeybee colonies in Pérez Zeledón, San José, during April and May 2024. Four colonies were selected, and a piece of honeycomb containing affected brood was collected. In the laboratory, uncapped brood was examined, and the larva was removed and placed in a petri dish for observation. In addition, the number of affected brood in each comb was estimated by counting the entire brood and calculating the proportion of affected brood. The type of pollen present in affected larvae and honeycombs was identified through palynological analysis. The presence of “Mal de Mayo” was recorded in most colonies starting April 11th. Upon examination of the combs on April 30th, 14.0% of larvae showed signs. As the disease progressed to severe levels (1.5 months later: May 26), 8 of 10 colonies were lost, and 1 was reduced to a nucleus. Furthermore, *Varroa destructor* mites and *Nosema* spp. microsporidia were present at low levels. Consequently, it can be inferred that “Mal de Mayo” disease caused considerable damage, since 80.0 % of the colonies exhibiting clinical signs were lost. The flowering period of the tree *Vochysia ferruginea* coincided with the onset, development, and conclusion of the disease.

Keywords: “Mal de Mayo” disease, larvae, pollen, Africanized honeybees.

Resumo

Na Costa Rica, tem sido reportada uma enfermidade das abelhas melíferas denominada “Mal de Maio”, a qual ocasiona a perda de colmeias durante abril e maio, em zonas como San Carlos e Pérez Zeledón. Ela se caracteriza pela presença de larvas com uma estrutura em forma de saco cheio de líquido, com sinais semelhantes aos descritos para a enfermidade de origem viral cria ensacada. Mediante diferentes ensaios descartou-se a presença de vírus e associou-se o quadro ao consumo de pólen de uma ou várias árvores ou plantas que florescem durante o período de sua aparição. O presente estudo foi realizado em um apiário de 10 colmeias de abelhas africanizadas em Pérez Zeledón, San José, durante abril e maio de 2024. Selecionaram-se quatro colmeias, das quais se coletou um segmento de favo com cria afetada. No laboratório, examinaram-se células com opérculos perfurados, removeu-se a larva e ela foi colocada em uma placa de Petri para sua observação. Além disso, estimou-se a quantidade de cria afetada em cada favo, quantificando sua totalidade e estabelecendo uma proporção. O tipo de pólen em larvas afetadas e nos favos foi identificado mediante análise palinológica. A presença do “Mal de Maio” foi registrada a partir de 11 de abril na maioria das colmeias do apiário. No momento da revisão dos favos (30 de abril), 14,0% das larvas apresentaram sinais, e, ao avançar a enfermidade até níveis severos (1,5 meses depois: 26 de maio), observou-se que, das 10 colmeias, oito foram perdidas, enquanto uma ficou reduzida a um núcleo. Além disso, determinou-se a presença do ácaro *Varroa destructor* e do microsporídio *Nosema* spp. em níveis leves. Diante do exposto, pode-se inferir que o “Mal de Maio” ocasionou danos consideráveis, já que 80,0% das colmeias que apresentaram o quadro clínico, foram perdidas. O período de floração da árvore *Vochysia ferruginea* coincidiu com o início, desenvolvimento e finalização da enfermidade.

Palavras chave: doença “Mal de Maio”, larvas, pólen, abelhas africanizadas.



Introducción

Se han descrito más de 35 enfermedades asociadas a las abejas melíferas, *Apis mellifera*, la mayoría de ellas ocasionan daños considerables en la apicultura (Bailey & Ball, 1991; Ritter, 2001).

Dos de las enfermedades de mayor importancia económica a nivel mundial, son la varroosis y la nosemosis. La varroosis es una parasitosis externa, causada por el ácaro *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) (Anderson & Trueman, 2000), el cual fue detectado en Costa Rica el 26 de septiembre de 1997 (Calderón et al., 1998; Van Veen et al., 1998). Mientras que la nosemosis es provocada por dos especies de microsporidios, *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, ambas forman esporas que infectan las células epiteliales del intestino de las abejas adultas (Botías et al., 2012; Traver & Fell, 2011). En nuestro país, la nosemosis causada por *N. apis*, fue descrita en 1985, mientras que en el año 2006 se detectó la especie *N. ceranae* (Calderón et al., 2008; Calderón & Ramírez, 2013).

Adicionalmente, en Costa Rica se ha descrito una enfermedad que afecta a la cría de las abejas melíferas, específicamente entre los meses de abril y mayo. Se indica una alta mortalidad de larvas, la suspensión de la oviposición de la reina y una disminución de la población de abejas adultas. Esta enfermedad se conoce como “mal de mayo” (Arce, H. & Van Veen, J., comunicación personal, 01 de marzo de 1997; Calderón, R. A., comunicación personal, 30 de abril de 1997; Van Veen et al., 2001). El “mal de mayo” ha sido reconocido durante varios años a nivel de campo por su cuadro clínico, en el que destaca la signología que conduce a una alta mortalidad de larvas y colmenas, especialmente las débiles (Van Veen et al., 2001).

Esta enfermedad se caracteriza por presentar los siguientes signos: distribución irregular de la cría, una cantidad considerable de celdas con opérculos perforados, dentro de la celda la cría afectada adquiere un aspecto de cono invertido, con la cabeza en posición hacia el opérculo y una coloración oscura (Arce, H. & Van Veen, J., comunicación personal, 01 de marzo de 1997). Conforme la enfermedad avanza, se observan larvas con el cuerpo oscuro o negro. Uno de los signos más característicos es la presencia de larvas con una estructura en forma de saco lleno de líquido transparente en la parte posterior del cuerpo (Calderón, R. A., comunicación personal, 30 de abril de 1997). Otra característica del “mal de mayo”, es su aparición estacional (entre los meses de abril y mayo), así como su localización en zonas apícolas específicas de nuestro país (Van Veen et al., 2001). Se debe indicar que los signos, daños y época de aparición son similares a los reportados para una enfermedad en Brasil, la cual afecta a la cría de las abejas melíferas entre los meses de noviembre y marzo (Message et al., 1995).

De acuerdo con observaciones realizadas en nuestro país (Van Veen et al., 2001), la signología del “Mal de Mayo” es muy similar a la descrita para la enfermedad viral Cría Sacciforme (Cría Ensacada o Peste Viral de la Cría), ocasionada por el virus *Morator aetatulas*, el cual afecta principalmente a la cría sellada (en la etapa de prepupas) de las abejas melíferas (Bailey & Ball, 1991). Este virus posee genoma ARN, tiene forma esférica y pertenece a la familia *Iflaviridae*, orden *Picornavirales* (Valles et al., 2017). Las larvas afectadas interrumpen el proceso de muda y la endo-cutícula no se desprende de su cuerpo (Ball, 1996). Se mencionan algunas hipótesis, por ejemplo, que el virus impide la formación de quitinasa (enzima que hidroliza la quitina) o que el virus altera el encéfalo y vías nerviosas de la larva, lo que impide el proceso de muda. Lo anterior, ocasiona la muerte de la larva y la formación de un saco con líquido ecdisial (líquido acuoso y claro), el cual contiene partículas vírales suficientes para infectar 1 000 colmenas (Allen & Ball, 1996; Bailey & Ball, 1991).

Con el propósito de relacionar o descartar la presencia de algún agente infeccioso, especialmente virus, Arce, H. & Van Veen, J. (comunicación personal, 01 de marzo de 1997) intentaron reproducir la enfermedad a



nivel experimental, tratando de infectar larvas de colmenas sanas a través de la inoculación con macerados acuosos de larvas enfermas. Se obtuvieron resultados negativos y se descartó preliminarmente la presencia de agentes virales en larvas enfermas por el “mal de mayo” (ensayos realizados en el Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT-UNA), Heredia). Además, se enviaron en dos ocasiones muestras de larvas afectadas al laboratorio especializado *IACR - Rothamsted Research* de Inglaterra, donde se realizaron pruebas para determinar la presencia de partículas virales. También se obtuvieron resultados negativos (Ball, B. & Allen, M., comunicación personal, 01 de marzo de 1997). Lo anterior, confirmó el diagnóstico preliminar, en el que se descartó la presencia de agentes vírales en larvas afectadas por el “mal de mayo”.

De acuerdo con lo indicado y a través de múltiples observaciones, se ha asociado la presentación de los signos de esta enfermedad, con alguna o algunas especies vegetales (árboles o plantas) que florecen abundantemente durante los meses de abril y mayo. Ello indicaría una fuerte relación con la ingesta de polen de esos árboles, ya que las abejas lo colectan durante la floración en las zonas afectadas, período que coincide con la aparición súbita de la enfermedad.

Se ha reportado que existen fuentes de néctar y polen que resultan tóxicos para las abejas, aunque no siempre es fácil de comprobar el envenenamiento, debido a que los incidentes suelen ser localizados y transitorios (Bailey & Ball, 1991). Además, se han reportado plantas, como el maíz, que contienen polen con baja cantidad de proteína y un gran porcentaje de almidón, el cual es considerado como un polen deficiente nutricionalmente para las abejas (Espina, 1984; Roubik, 1989). Por otro lado, se ha estudiado el contenido de aluminio en pupas de abejorros (*Bombus* spp.), como una de las posibles causas en la disminución de las poblaciones de abejas y de otros polinizadores, ya que es neurotóxico y, además, se considera el contaminante ambiental más importante (Exley et al., 2015). Se debe mencionar, que algunas especies de árboles presentes en las zonas de mayor incidencia del “mal de mayo” en nuestro país, como el *Vochysia guatemalensis* y *Vochysia ferruginea* (Van Veen et al., 2001), acumulan altos niveles de aluminio en los tejidos foliares (Alvarado-Hernández et al., 2022).

Debido a la poca investigación relacionada con la enfermedad “mal de mayo”, en abejas africanizadas en las condiciones tropicales de Costa Rica, en el presente estudio, se evaluaron colmenas con signos asociados a esta enfermedad en Pérez Zeledón. Además, al ser un tema poco abordado, se realizó una revisión de los antecedentes del “mal de mayo” en nuestro país y de una situación similar reportada en Brasil, lo cual permite contextualizar la problemática.

Revisión de antecedentes sobre el “mal de mayo”

En Costa Rica, se ha reportado la enfermedad denominada “mal de mayo” (Van Veen et al., 2001). Algunas zonas apícolas del país, en las que se ha presentado de manera periódica, ocasionando daños de importancia económica son Horquetas de Sarapiquí, Turrialba, San Carlos y Pérez Zeledón, entre otras (Arce, H., comunicación personal, 01 marzo de 1997). Esto afecta de manera considerable el desarrollo de la apicultura en dichas regiones. Esta enfermedad ha sido reconocida durante varios años a nivel de campo por su cuadro clínico. Los apicultores asocian su incidencia con la floración del árbol de mayo, lo que guarda estrecha relación con su nombre. En estas localidades, durante la época de aparición del “mal de mayo” hay varias especies de árboles en floración, destacándose el nance (*Byrsonima crassifolia* L.) y el mayo o botarrama (*Vochysia* spp.).



Aun cuando no se han cuantificado los daños económicos que ocasiona el “mal de mayo” en los lugares de mayor incidencia, en un estudio en el que se instaló un apiario experimental, constituido por ocho colmenas en el cantón de Pérez Zeledón, se determinó que seis colmenas murieron (75.0 %) y dos quedaron con una población muy baja de abejas adultas (reducidas a núcleos) (Jean, 1998).

En Brasil se ha reportado una enfermedad con signos similares a los observados en Costa Rica, la cual afecta la cría entre los meses de noviembre y marzo (Message et al., 1995). Las investigaciones la denominan “enfermedad brasileña similar a la cría sacciforme (Brazilian sacbrood-like disease: BSBD). Esta enfermedad, ha causado pérdidas cuantiosas a un número considerable de apicultores. Además, presenta signos semejantes a los del virus de la cría sacciforme, en varios casos se observa hasta un 100 % de la cría afectada. Además, las colonias fuertes disminuyen su población a la mitad en 15 días después de su inicio. Preliminarmente, en Brasil, realizaron diferentes análisis para aislar el virus de la cría sacciforme, no obstante pruebas aplicadas con métodos serológicos resultaron negativas (Message et al., 1995). Por lo cual, una línea de “*Thai Sac Brood Virus*” (TSBV), fue propuesta como causante de esta enfermedad. Sin embargo, mediante estudios epidemiológicos, Pimentel & Message (2004) relacionaron el polen como posible agente causal. Para evaluar esta hipótesis, alimentaron, en laboratorio, larvas con una mezcla de jalea real, agua, fructuosa, glucosa y con polen sospechoso, logrando reproducir la signología de la enfermedad. Debido a la presencia de polen de diferentes plantas, en ensayos sucesivos, alimentaron larvas con fuentes de polen más específicas. Indicaron que el polen de *Stryphnodendron* spp. Martius (Barbatimao), es el agente causal. Más específicamente, relacionaron las especies *S. polyphyllum* y *S. adstringens*, ambas especies de la familia Fabaceae. El efecto tóxico ha sido atribuido a la concentración de taninos en el polen. Se indicó que esta sustancia puede causar daños en el desarrollo larval y que su presencia depende de diferentes factores como el origen botánico, la naturaleza del suelo, las características genéticas de las plantas y las condiciones climáticas de la zona (Amâncio, 2014). El efecto tóxico fue asociado con la presencia de ácido tánico, también denominado ácido galotánico o galotánino (Santos, 2007).

Estudio sobre la relación del polen como posible agente causal del “mal de mayo”

Con el objetivo de determinar la relación del polen como posible agente causal del “mal de mayo” en larvas de abejas, se colectó polen en un apiario de ocho colmenas durante el mes de abril de 1997, en el cantón de Pérez Zeledón. El 90 % del polen colectado se utilizó en la alimentación de seis núcleos de abejas (colonias pequeñas) en Lagunilla de Heredia (instalaciones del CINAT-UNA, donde no se ha reportado la enfermedad). El restante 10 % se usó para identificar el origen botánico, mediante análisis palinológico (Jean, 1998). El método de alimentación consistió en suministrar directamente a los núcleos una mezcla de polen fresco con miel de abeja (en una relación de 3:1), en forma de una torta sobre los marcos. Por otra parte, se utilizaron dos núcleos (T1 y T2) como control, los cuales se alimentaron semanalmente con una solución de agua y miel (300 ml), en una proporción de 1:1.

Los núcleos alimentados con la torta de polen (sospechoso) se revisaron cada cuatro días durante dos meses (abril-mayo), con la finalidad de detectar la aparición de los signos de la enfermedad “mal de mayo”. Uno de los principales resultados obtenidos es que, de los seis núcleos alimentados con polen, dos de ellos (identificados como A y C) presentaron la signología descrita para el “mal de mayo”. Se observaron panales con opérculos perforados (semiabiertos y abiertos), celdas abiertas y vacías alrededor de las larvas afectadas. Larvas en la celda con la cabeza hacia arriba y oscura (estadio de prepupa), encorvadas en forma de barquillo (media luna). Al retirar las larvas de



las celdas, se observaron larvas con la cabeza negra (necrosada), larvas con el cuerpo de color gris oscuro, larvas con el cuerpo oscuro o negro (necrosado) y larvas con la presencia de un saco lleno de líquido (color transparente o amarillento) en la parte posterior del cuerpo (Calderón, R. A., comunicación personal, 30 de mayo de 1997; Jean, 1998). Para estimar la cantidad de cría afectada, se utilizó un marco cuadrículado de 25 cm², se realizó un conteo de larvas afectadas por panal, tanto en los núcleos, como en las colmenas que enfermaron. En el núcleo A, se obtuvo un 10 % de larvas afectadas, mientras que en el núcleo C un 2 %. Por otro lado, en las colmenas que enfermaron en Pérez Zeledón, se observó al momento de evaluarlas un 21 % de larvas afectadas.

Inoculación de núcleos sanos: por otro lado, se trató de reproducir la signología de esta enfermedad, mediante la inoculación de núcleos sanos con macerados de larvas enfermas por el “mal de mayo”, mediante alimentación y aspersión directa. El principal objetivo de esta inoculación fue confirmar o descartar la presencia de algún agente infeccioso causando la enfermedad, especialmente el virus de la cría sacciforme. Se ha reportado que, cuando este virus se añade al alimento de larvas sin opercular, mueren poco tiempo después de sellada la celda (Bailey & Ball, 1991). Para realizar la inoculación, larvas enfermas se maceraron en agua destilada en una relación de una larva por 1.0 cc de agua. El macerado se filtró en papel de tipo Watman #2 con un tiempo de filtrado medio. Luego el sobrenadante se filtró nuevamente en papel de tipo Watman #42 de velocidad de filtrado lento. Posteriormente, se utilizó un filtro para bacterias de tipo Millipore con un diámetro de 0.45 micras. Se utilizaron dos núcleos para la inoculación, a cada uno se le aplicó el filtrado de las larvas enfermas, a través de alimentación y aspersión. Para realizar la alimentación, se preparó una solución de 80 g de azúcar en 200 ml de agua, a la cual se agregó 20 ml del filtrado y se colocó en un alimentador interno. Mientras que, para la aspersión, el filtrado se aplicó directamente mediante un aspersor a cada panal con cría abierta, en una relación de 6.0 ml (6 aspersiones) de la solución por cada lado del panal. Además, se usó un núcleo control, al que se le proporcionó una solución de azúcar. Se revisó minuciosamente la cría de los panales (inoculados y control) cada cuatro días durante un mes. No se observaron larvas con signos de enfermedad (Calderón, R. A., comunicación personal, 30 de mayo de 1997).

Microscopio electrónico: adicionalmente y con el objetivo de determinar o descartar la presencia de partículas virales en la cría afectada, larvas que presentaron la signología descrita y provenientes de las zonas en estudio, se maceraron en Buffer PBS en una relación de una larva en un 1.0 cc. Las larvas maceradas se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 20 minutos. Se obtuvo un sobrenadante claro, el cual se ultrafiltró. Se tomó el sobrenadante de cada muestra (en forma separada) con una jeringa estéril de 5.0 cc y se procedió a filtrar con microfiltros tipo membrana (Sterile Acrodisc[®], 0.45 μ m (micras), Low Protein Binding, Non-Pyrogenic, Pressure Limitations: 5.3Kg/cm², Gelman Sciences). El filtrado se recogió en tubos Eppendorf estériles y las muestras se revisaron en el microscopio electrónico de transmisión (Universidad de Costa Rica-UCR). Se preparó una membrana con rejilla, la cual se colocó sobre una gota de la muestra durante un minuto. Posteriormente, se secó la rejilla, colocándola sobre un papel absorbente. Luego, se colocó la rejilla sobre una gota de ácido fosfotúngstico al 2 %, el cual proporciona la tinción negativa. Se secó la rejilla nuevamente y se revisó en el microscopio electrónico a 100 000, 150 000 y 200 000 aumentos. Se obtuvieron resultados negativos que confirman la ausencia de agentes virales (Calderón, R. A., comunicación personal, 30 de mayo de 1997).

Por tanto, siendo el polen la variable introducida y no habiéndose observado la presencia de esta enfermedad en la zona de Heredia, se indicó que el polen estaba involucrado como posible agente causal del “mal de mayo” en las larvas afectadas.



Identificación del polen: en las muestras de polen colectado, se identificaron mediante análisis palinológico 36 especies de plantas, pertenecientes a 26 familias botánicas (Jean, 1998). El análisis del espectro de las plantas visitadas por las abejas mostró que el café fue una fuente muy importante de polen, ya que estuvo presente en forma dominante en la mayoría de las muestras (70.9 %). Por otro lado, el polen del género *Vochysia* spp. fue visitado en una proporción del 0.5 %. Las otras 34 especies restantes se hallaron en una relación menor al 10.0 %. Al analizar las especies de polen utilizadas en la alimentación de los núcleos A y C en Heredia, los cuales presentaron los signos del “mal de mayo”, se determinó la presencia de siete familias (géneros y especies) (Cuadro 1). Con base en estos resultados de alimentación, las especies *Cordia alliodora* (Boraginaceae) (4.05 %), *Bombacopsis quinata* (Bombacaceae) (0.60 %), *Paullinia* sp., *Cupania* sp. (Sapindaceae) (0.54 %), *Vochysia ferruginea* (Vochysiaceae) (0.54 %) y *Urera* sp. (Urticaceae) (0.18 %), pueden considerarse como sospechosas de ser la causa del “mal de mayo”. Por otro lado, las familias Rubiaceae, Anacardiaceae y Asteraceae que también estuvieron presentes en las muestras de polen que indujeron la enfermedad en los núcleos no se incluyen como sospechosas, debido a su amplia distribución en zonas donde no se ha reportado la enfermedad (Sánchez, L., comunicación personal, 30 de junio de 1997; Jean, 1998).

Cuadro 1. Familias (género y especie) de polen utilizado en la alimentación de los núcleos (A y C) que presentaron la signología descrita para el “mal de mayo” en el CINAT, Lagunilla de Heredia (se indica las fechas de alimentación).

Familia	Género - especie	4 abril	14 abril	17 abril	21 abril	24 abril	30 abril
Anacardiaceae	<i>Spondias mombin</i>	A - C	A	C	C		C
Annonaceae	<i>Annona muricata</i>					C	
Asteraceae	<i>Tridax procumbens</i>		A				C
Bombacaceae	<i>Bombacopsis quinata</i>		A	C		C	C
Boraginaceae	<i>Cordia alliodora</i>		A	C	C	C	C
Burseraceae	<i>Bursera simaruba</i>	A - C	A	C			
Cecropiaceae	<i>Cecropia insignis</i>	A - C					
	<i>Cecropia peltata</i>	A - C					
Convolvulaceae	<i>Ipomea</i> sp.		A		C	C	
Euphorbiaceae	<i>Croton</i> sp.			C	C		C
Fabaceae	<i>Croton draco</i>		A	C	C	C	
Melastomataceae	<i>Clidemia</i> sp.			C		C	
Moraceae	<i>Brosimum alicastrum</i>				C		
Myristicaceae	***				C		
Myrtaceae	<i>Syzygium malaccensis</i>		A	C	C	C	
	<i>Psidium guajava</i>		A	C	C	C	
	<i>Psidium friedrichthalianum</i>		A	C	C	C	
Palmae	<i>Elaeis guineensis</i>						C
Papilionaceae	<i>Desmodium</i> sp.	A - C	A		C	C	
Piperaceae	<i>Piper</i> sp.						C
Polygonaceae	<i>Coccoloba</i> sp.		A				
Rhamanaceae	***	A - C					
Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>	A - C	A	C	C	C	C
Rutaceae	<i>Zanthoxylum</i> sp.		A	C			
	<i>Paullinia</i> sp.						
Sapindaceae	<i>Cupania</i> sp.	A - C	A	C	C	C	C
Urticaceae	<i>Urera</i> sp.	A - C	A			C	C
Vitaceae	<i>Vitis</i> sp.		A			C	
Vochysiaceae	<i>Vochysia ferruginea</i>	A - C	A			C	

*** No se logró identificar a nivel de género.



Nivel de proteína en el polen: el análisis químico de dos muestras de polen de Pérez Zeledón (Cuadro 2), determinó un 19.5 % de proteína cruda, lo cual está considerado dentro del requerimiento óptimo de las abejas (Crane, 1990). Sin embargo, la deficiencia en la dieta de las abejas de algunas sustancias o elementos contenidos en el polen, especialmente de algunos aminoácidos esenciales, puede conllevar al desarrollo de enfermedades denominadas carenciales o de deficiencia nutricional (Bailey & Ball, 1991). Por tanto, aun cuando el nivel de proteína cruda es aceptable, debe realizarse un análisis nutricional más detallado, para descartar la deficiencia de algún aminoácido. También se debe considerar la determinación de taninos en su composición, por su efecto en el desarrollo larval (Amâncio, 2014).

Cuadro 2. Análisis químico del nivel de proteína cruda en muestras de polen provenientes de Pérez Zeledón.

Muestra	Peso (g)	H2S04 (i)	H2SO4 (f)	Diferencia	% N	% PC
1	0.1	13.10	15.50	2.40	3.06	19.1
2	0.1	15.50	18.00	2.50	3.19	19.9

Fuente: Laboratorio de Nutrición, Escuela de Ciencias Agrarias – UNA.

Nota:

Muestra 1: Corresponde a la colmena VII, 14 de abril de 1997.

Muestra 2: Corresponde a las colmenas II, VII y VIII, 21 de abril de 1997.

Estudio sobre el polen presente en el sistema digestivo de larvas de abejas melíferas afectadas por el “mal de mayo”

El propósito del estudio fue identificar el espectro polínico presente en el sistema digestivo de larvas afectadas por el “mal de mayo”, provenientes de Pérez Zeledón, Horquetas de Sarapiquí y Lagunilla de Heredia y establecer una posible relación entre el polen identificado y el desarrollo de la enfermedad. Además, se comparó el polen presente en el sistema digestivo con el polen colectado de colmenas durante la época en que la enfermedad se presentó y con ello reducir el espectro de tipos polínicos que podrían estar involucrados con la presentación del “mal de mayo” (Calderón, R. A. & Cortés, I., comunicación personal, 30 de enero de 1998).

El polen es una fuente de proteínas, grasas, vitaminas y minerales para las abejas, sustancias necesarias para mantener su crecimiento, maduración y sobrevivencia (Dade, 1994; Harbone, 1985; Roubik, 1995). Además, el polen posee enzimas que permiten la digestión de algunas proteínas, las cuales son necesarias para proveer de alimento a los músculos de vuelo, a las glándulas de cera y a diferentes tejidos (Dadant, 1992; Roubik, 1989). La composición nutricional del polen varía entre las diferentes especies vegetales y dentro de la misma especie, dependiendo de las condiciones del ambiente, la edad y el vigor de la planta (Free, 1993; Girón, 1996). Por ejemplo, se ha reportado polen de baja calidad nutricional, como el polen de diente de león, conocido por ser deficiente en arginina, un aminoácido esencial para el desarrollo de la abeja (Velthuis, 1992).

El estudio se realizó con larvas afectadas por el “mal de mayo”, procedentes de Pérez Zeledón y Horquetas de Sarapiquí, localidades en las que se tienen reportes de una alta incidencia de la enfermedad (Arce, H., comunicación personal, 01 marzo de 1997). Además, se analizaron larvas que resultaron positivas a la enfermedad en Lagunilla de Heredia, luego de ser alimentadas con polen proveniente de colmenas enfermas de Pérez Zeledón.



Las muestras de panal se conservaron en congelación durante siete meses hasta el inicio del estudio. A su vez, las muestras de larvas en diferentes estadios de la enfermedad se conservaron en viales previamente identificados conteniendo alcohol al 70 %. En los panales, las larvas afectadas se retiraron cuidadosamente de las celdas y se clasificaron en dos grupos de acuerdo con el desarrollo de la enfermedad: larvas en estado inicial, cuya mayor particularidad fue la presencia de un saco lleno de líquido transparente en la parte posterior del cuerpo y larvas en estado avanzado, las que presentaban características de dureza, secas (momificada) y coloración oscura.

Las larvas se colocaron individualmente en una caja Petri y se les realizó una disección preliminar para separar los tejidos. Debido a la imposibilidad de observar el polen, por la presencia de gran cantidad de tejido larval, se agregó KOH al 5 %, para disolverlo. Después de aplicar el KOH, las larvas se incubaron a una temperatura de 25 °C, durante 24 horas. Posteriormente, se retiró la cutícula larval y los residuos se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento se utilizó para el montaje y la tinción del polen.

Los tipos polínicos se identificaron y se clasificaron a nivel de género y especie, de acuerdo con la colección de referencia del CINAT, con la colaboración de los departamentos de palinología del CINAT y de la Universidad de Utrecht de Holanda (Países Bajos), así como con fotos y esquemas reportados en la bibliografía (Sánchez, L. A. & Cortés, I., comunicación personal, 30 de enero de 1998).

Adicionalmente, el polen presente en el sistema digestivo de larvas enfermas se comparó con el polen colectado mediante trampas por colmenas afectadas por el “mal de mayo” en Pérez Zeledón y Horquetas de Sarapiquí (Jean, 1998). Con esta comparación, se obtuvo las especies de plantas que coincidieron en ambos estudios y se estableció una lista de posibles especies responsables de la enfermedad.

Con base en el análisis del polen presente en el sistema digestivo de 124 larvas afectadas por el “mal de mayo” provenientes de Pérez Zeledón, 37 de Horquetas de Sarapiquí y 44 de Lagunilla de Heredia, se obtuvo un grupo de plantas melíferas identificadas por cada área de estudio. En el análisis de polen en larvas de Pérez Zeledón se hallaron 66 especies pertenecientes a 40 familias, en Lagunilla de Heredia se identificaron 74 especies de plantas correspondientes a 36 familias, mientras que en larvas provenientes de Horquetas de Sarapiquí se identificaron 42 especies de plantas ubicadas dentro de 23 familias (Calderón, R. A. & Cortés, I., comunicación personal, 30 de enero de 1998).

Se comparó el espectro de polen presente en el sistema digestivo de larvas enfermas y el polen colectado en colmenas afectadas por el “mal de mayo”. El análisis de los tipos de polen identificados en el sistema digestivo de larvas enfermas en las tres zonas geográficas permitió la identificación de 75 especies de plantas, las cuales corresponden a 40 familias. De este total, 32 especies de plantas correspondientes a 19 familias estuvieron presentes en las tres localidades (Cuadro 3).



Cuadro 3: Especies de plantas presentes en las zonas de Pérez Zeledón, Horquetas de Sarapiquí y Lagunilla de Heredia, identificadas mediante el análisis del polen proveniente del sistema digestivo de larvas afectadas por el “mal de mayo”.

Familia	Nombre científico	Nombre común
Amaranthaceae	<i>Amaranthus sp.</i>	
Asteraceae	<i>Tridax procumbens</i>	Hierba San Juan
	<i>Vernonia patens</i>	Tuete
Burseraceae	<i>Bursera simarouba</i>	Indio desnudo, jinocuabe
Cecropiaceae	<i>Cecropia insignis</i>	Guarumo blanco
	<i>Cecropia peltata</i>	Guarumo
Cyperaceae	<i>Cyperus sp.</i>	
Euphorbiaceae	<i>Croton sp.</i>	
	<i>Croton draco</i>	Targuá
	<i>Croton Xalapensis</i>	Targuá
	<i>Manibot esculenta</i>	Yuca
	<i>Ricinus communis</i>	Higuerilla
Fabaceae	<i>Desmodium sp.</i>	Mozote o pegapega
	<i>Inga sp.</i>	Guaba
Lecythidaceae	***	
Melastomataceae	<i>Clidemia dentata</i>	Purra
	<i>Miconia sp.</i>	Lengua de vaca
Moraceae	<i>Brosimum alicastrum</i>	
Myrtaceae	<i>Eugenia sp.</i>	
	<i>Psidium guajava</i>	Guayaba
	<i>Syzygium malaccense</i>	Manzana de agua
Palmae	<i>Bactris gasipaes</i>	Pejibaye
Piperaceae	<i>Piper sp.</i>	Cordoncillo
Poaceae	<i>Hyparrhenia rufa</i>	Jaragua
	<i>Panicum maximum</i>	Guinea
	<i>Paspalum sp.</i>	
	<i>Sporobolus indicus</i>	Pitilla
Polygonaceae	<i>Coccoloba acuminata</i>	Papaturrillo
	<i>Coccoloba sp.</i>	
Sapindaceae	<i>Serjania sp.</i>	
Ulmaceae	<i>Trema micranta</i>	Capulín, vara blanca
Urticaceae	<i>Urera sp.</i>	Ortiga
Vochysiaceae	<i>Vochysia guatemalensis</i>	Botarrama

***No fue posible identificar a nivel de género.

Con el fin de delimitar el número de especies de plantas que podrían estar involucradas con el desarrollo del “mal de mayo”, se utilizaron las plantas identificadas mediante técnicas palinológicas procedentes de polen de colmenas enfermas en Pérez Zeledón y Horquetas, analizadas previamente (Jean, 1998). Estas especies se compararon con las especies identificadas a partir del polen presente en el sistema digestivo de larvas enfermas de las tres localidades involucradas en este estudio. Las especies de plantas que se trasladaron



son *Inga* sp., *Desmodium* sp. (Fabaceae), *Bursera simarouba* (Burseraceae), *Croton draco* (Euphorbiaceae), *Syzygium malaccense* (Myrtaceae) y *Vochysia guatemalensis* (Vochysiaceae) (Cuadro 4). Dichas especies están reportadas en los estudios como plantas visitadas por las abejas para la obtención de polen o néctar (Arce et al., 2001; CARABIS, 1994; Crane, 1990; Girón, 1996; Roubik, 1995).

En el caso de los géneros *Inga* sp. y *Desmodium* sp. no fue posible identificar la especie por falta de referencias claras. En Costa Rica se encuentra un gran número de especies correspondientes a estos géneros, los cuales se ubican desde los 0 hasta 1800 msnm (Holdridge et al., 1997), por lo que estas plantas se descartan como responsables del “mal de mayo”.

El *Croton draco* se presenta en hábitat con elevaciones de 700 a 2000 msnm, principalmente en la Cordillera Central. Florece entre los meses de febrero y septiembre, aunque puede florecer todo el año. *Croton draco* es una planta visitada por las abejas para la recolección de polen y néctar (Arce et al., 2001). Por lo que probablemente esta especie no sea la responsable del “mal de mayo”, ya que los apiarios ubicados en los alrededores de Alajuela, Heredia y San José se verían afectados por la enfermedad.

Manzana de agua (*Syzygium malaccense*), es una especie asiática introducida al país, la cual es cultivada desde 610 a 2740 msnm (Morton, 1987). La mayor floración va de febrero a julio. Es considerada una especie polinífera, muy visitada por las abejas (Roubik, 1995). Sin embargo, no se debe descartar esta especie, ya que, dependiendo de las condiciones del medio ambiente, la edad y nutrición de la planta, la composición química del polen, su valor nutritivo para las abejas varía (Roubik, 1995).

El indio desnudo (*Bursera simarouba*), se encuentra distribuido en el Valle Central, Guanacaste, Norte de Costa Rica (La Selva, Caño Negro), Zona Atlántica, Pacífico Central (Monte Verde) y Pacífico Sur (Corcovado). El periodo de floración se extiende entre los meses de mayo a junio. Es una fuente importante de polen y néctar para las abejas (Arce et al., 2001; CARABIS, 1994). De acuerdo con estas características, es poco probable que el indio desnudo sea el responsable de la enfermedad.

Tanto *Vochysia guatemalensis* como *Vochysia ferruginea* son conocidos indistintamente como botarrama, palo de mayo, palo de chanco y árbol de mayo. Algunas especies de *Vochysia* son establecidas en comunidades de bosque virgen y bosque húmedo, otros se encuentran en áreas boscosas madereras. Su hábitat se establece entre 100 hasta 900 m de elevación. El género *Vochysia* se encuentra establecido en forma aislada en el Pacífico Central y Valle Central, mientras que la especie tiende a predominar en Pérez Zeledón, Sarapiquí, San Carlos y Turrialba (Camacho et al., 2016; COSEFORMA, 1998). La época de producción de flores varía según la región. En Siquirres florece en noviembre con un pico de floración entre abril y mayo, en San Carlos entre abril y mayo, en Sarapiquí entre abril y junio, mientras que en Guápiles entre enero y mayo (Camacho et al., 2016). Los reportes de la enfermedad “mal de mayo” en el país, se localizan en las áreas de mayor predominio del *Vochysia*. Por tal razón, el *Vochysia guatemalensis* así como el *Vochysia ferruginea* pueden considerarse como sospechosos de ser la causa del “mal de mayo”. En cuanto a la composición química del género *Vochysia*, se conoce que *V. cinnamomea* tiene desoflavonas. Diferentes especies contienen ácido elágico, el alcaloide voquisina y otros alcaloides. Mientras que las especies *V. guatemalensis* y *V. ferruginea* acumulan altos niveles de aluminio en los tejidos foliares (Alvarado-Hernández et al., 2022).



Cuadro 4. Coincidencia entre las especies de plantas identificadas mediante análisis palinológico de larvas afectadas por el “mal de mayo” en las zonas de estudio y las especies identificadas en colmenas de Pérez Zeledón y Horquetas de Sarapiquí.

Familia	Nombre científico	Nombre común
Burseraceae	<i>Bursera simarouba</i>	Indio desnudo, jinocuabe
Euphorbiaceae	<i>Croton draco</i>	Targuá blanco
Fabaceae	<i>Inga sp.</i>	Guaba
	<i>Desmodium sp.</i>	Mozote o pegapega
Moraceae	<i>Ficus sp.</i>	Higuerón
Myrtaceae	<i>Syzygium malaccensis</i>	Manzana de agua
Vochysiaceae	<i>Vochysia guatemalensis</i>	Botarrama
	<i>Vochysia ferruginea</i>	Árbol de mayo

Materiales y métodos

Ubicación y manejo general del apiario: el estudio se realizó en un apiario constituido por 10 colmenas de abejas africanizadas (*A. mellifera*) (Spivak, 1991), en Finca la Palmira, Sede Brunca de la Universidad Nacional, Pérez Zeledón, San José, localizado entre las coordenadas geográficas 09°20'28" latitud norte y 83°44'26" longitud oeste. A una altitud de 810 msnm, una temperatura promedio de 24.3 °C y una precipitación de 2955.2 mm (Chinchilla, 1987). Se clasifica como bosque húmedo premontano (transición a basal) y bosque húmedo tropical (transición a premontano) (Holdridge, 1978). En esta zona, la apicultura se considera una actividad de importancia económica (Espina, 1984). La colecta de datos se llevó a cabo entre abril y mayo 2024 (transición a época lluviosa), meses en los cuales se ha reportado una alta incidencia del “mal de mayo” (Van Veen et al., 2001).

Colmenas evaluadas: cada colmena estaba constituida por ocho panales con cría en diferentes estadios de desarrollo y panales con reservas de miel y polen. La alimentación de las colmenas fue similar al que se realiza en un apiario comercial, se les proporcionó jarabe de azúcar (una parte de azúcar y una parte de agua), una vez por semana durante el periodo lluvioso.

Muestras de panal: de cuatro colmenas, se seleccionó un panal con cría afectada y se cortó un segmento de 10 x 10 cm. Las muestras de panal se envolvieron en papel periódico, luego se colocaron en un sobre de papel y se trasladaron al laboratorio de Patología Apícola del CINAT-UNA, para su revisión.

Revisión de los panales: en el laboratorio, se examinó la distribución de la cría sellada y la presencia de celdas con opérculos perforados. Aquellas celdas con opérculos dañados o semi abiertos se desopercularon totalmente y la larva se removió de la celda y se colocó en un plato de Petri para su observación y descripción de los signos. Además, se estimó la cantidad de cría afectada en cada panal, cuantificando la totalidad de la cría y estableciendo una proporción.

Diagnóstico de otras enfermedades: tanto los panales, como las abejas adultas de las colmenas afectadas, se analizaron para determinar la presencia de otras enfermedades, como varroosis y noseosis.

Varroosis: se colectó una muestra de aproximadamente 100 abejas, en un frasco de plástico de boca ancha, al cual se le agregó una solución jabonosa (300 ml de agua más 0.5 g de detergente en polvo). El frasco se agitó por



un minuto para separar los ácaros del cuerpo de las abejas (De Jong, 1997). El líquido se filtró a través de un cedazo de ocho agujeros por pulgada para separar las abejas. Luego, el líquido filtrado se tamizó por segunda vez a través de un cedazo fino, donde quedaron retenidos los ácaros. Para determinar el nivel de infestación de la muestra, se cuantificaron tanto los ácaros como las abejas (Calderón et al., 1998). El resultado se expresó como un porcentaje, obtenido de la relación: número de ácaros / número de abejas adultas x 100.

Nosemosis: se utilizó el método de Cantwell, para lo cual se colocaron 30 abejas sobre un papel absorbente. Posteriormente, los abdómenes se separaron y colocaron en un mortero, donde se maceraron, añadiendo por cada abdomen 1.0 ml de agua destilada (total= 30 ml). El macerado se homogenizó, agitándolo constantemente durante un minuto y se revisó en el microscopio a un aumento de 40 x. Se procedió a determinar el número de esporas mediante el hemocitómetro y a establecer el nivel de infección.

Identificación del polen presente en larvas y panales: larvas afectadas con los signos de la enfermedad (n= 10), se maceraron con agua destilada en una relación de 1.0 cc por larva. Para identificar la presencia de polen, el macerado se fijó en un portaobjetos, se tiñó con safranina y se revisó en el microscopio a un aumento de 40 y 100 x. Asimismo, el polen almacenado en las celdas (pan de abeja) fue removido utilizando pinzas y agujas de disección. El polen extraído se homogenizó y se procedió a tomar tres muestras para realizar láminas fijas con sus respectivos duplicados. Cada lámina se preparó con glicerina sólida y se utilizó safranina como medio de tinción. Para la identificación, las láminas se revisaron al microscopio a 40 y 100 x, realizando 10 conteos aleatorios en los campos ópticos. Mediante el análisis palinológico se determinó el origen botánico del polen, lo cual proporcionó una idea global de la interacción entre las abejas y las plantas (Martínez, 1993).

Resultados

Revisión preliminar del apiario en Pérez Zeledón: el 03 de abril 2024, se revisaron panales con cría de cuatro colmenas, con la finalidad de detectar signos de la enfermedad. No se determinó ningún signo relacionado con el “mal de mayo”.

Presentación del “mal de mayo”: la presencia de la enfermedad “mal de mayo” en el apiario ubicado en Pérez Zeledón, se determinó a partir del 11 de abril 2024. Luego de esa fecha, se observó el cuadro clínico característico de la enfermedad, afectando la mayoría de las colmenas del apiario. Se observaron celdas con opérculos perforados (semiabiertas o totalmente abiertas), cría salteada, larvas con la presencia de una estructura en forma de saco conteniendo líquido transparente en la parte posterior del cuerpo (característico de la enfermedad). Además, se observaron larvas con aspecto de un cono invertido, larvas con la cabeza oscura apuntando hacia el opérculo, entre otros.

Al momento de revisar los panales, los cuales se colectaron el 30 de abril 2024, un 14.0 % (en promedio) de las larvas (prepupas) presentaron signos observados en cría afectada por el “mal de mayo” (Cuadro 5).

Después de haber avanzado la enfermedad hasta niveles severos, se evaluó las colmenas 1.5 meses después de su inicio (26 de mayo 2024), para encontrar que, de 10 colmenas establecidas para realizar el ensayo, ocho se perdieron totalmente (80 %), es decir, no quedaron abejas. Una colmena quedó reducida a núcleo, con poca cantidad de abejas, y requirió manejo para recuperarla (reforzamiento con panales con cría). Un aspecto para considerar es que en los panales de la mayoría de las colmenas que se perdieron, había reservas de miel y polen.



Cuadro 5. Cantidad de cría afectada con signos del “mal de mayo” (n= 4 colmenas).

ID de la colmena	Cantidad (%) de cría afectada con signos del “mal de mayo”	signos observados en la cría y en los panales
C-3	15.0	Larvas con saco lleno líquido
C-4	10.0	Celdas opérculos perforados
C-9	20.0	Larvas con la cabeza oscura
C-10	10.5	Larvas con el cuerpo oscuro
Promedio= 14.0 ± 5.0		

Presencia de otras enfermedades: adicionalmente, las colmenas (panales y abejas adultas), se analizaron en el laboratorio para determinar otras enfermedades, como varroosis y nosemosis. Se determinó la presencia del ácaro *V. destructor* en niveles de infestación de leve a moderado, mientras que el microsporidio *Nosema* spp., se encontró en niveles leves de infección. Por otro lado, no se observó la presencia de acariosis (*Acarapis woodi*), ni del pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de abejas adultas para determinar la presencia de varroosis, nosemosis, acariosis y el pequeño escarabajo de la colmena (n= 4).

Identificación de la colmena	Lugar de colecta muestra*	Varroosis nivel infestación (%)**	Nosema intensidad de la infección	Acariosis	Pequeño escarabajo
C-3	P	1.0	Leve		
	CC	2.5	Leve	Negativo	Negativo
C-4	P	No se observó	Leve		
	CC	9.5	Nula	Negativo	Negativo
C-9	P	No se observó	Leve		
	CC	7.0	Nula	Negativo	Negativo
C-10	P	No se observó	Nula		
	CC	5.0	Leve	Negativo	Negativo
Colmenas positivas		Positivo= 100%	Positivo= 100%	Positivo= 0%	Positivo= 0%

* P= piquera; CC= cámara de cría.

** Nivel de infestación de Varroosis: leve= 1 a 5 %; moderado= 5 a 10 %; fuerte= 10 % o más.

Habiendo confirmado niveles leves del ácaro varroa y del microsporidio *Nosema* spp. y descartado la presencia de enfermedades como acariosis y el pequeño escarabajo de la colmena, se puede inferir que la enfermedad “mal de mayo” ocasionó pérdidas considerables, ya que se perdió el 80.0 % de las colmenas que mostraron el cuadro clínico. Además, la población de una de las colmenas (10.0 %), se redujo a núcleo. Con base en lo anterior, se disminuyó severamente la expectativa de producción de miel (promedio= 20-35 kg/colmena), ya que de 200-350 kg de miel que producen 10 colmenas en una temporada promedio, únicamente se podrían obtener 40-70 kg (20 %).

Identificación del polen presente en las larvas: se examinaron larvas con presencia de un saco con líquido en la parte posterior de su cuerpo, para determinar la presencia y tipo de polen dominante. Se estableció mediante análisis palinológico, la presencia de polen del género *Vochysia ferruginea* (Vochysiaceae).



Identificación del polen presente en los panales: en las muestras de pan de abeja (polen almacenado en las celdas) examinadas mediante análisis palinológico, se identificó el polen de *Vochysia ferrugínea* (Vochysiaceae), el cual estuvo presente en los diferentes conteos (n= 153 granos de polen) (27.4 ± 12.8).

Discusión

Las abejas constituyen el grupo de polinizadores más importante, tanto de cultivos agrícolas, como de plantas silvestres (Crane, 1990; Free, 1993; Roubik, 1989). En nuestro país, apicultores de zonas como Pérez Zeledón, Horquetas de Sarapiquí, San Carlos, Turrialba y otras localidades, padecen año tras año, una importante disminución en su actividad apícola, debido a la presentación de la enfermedad “mal de mayo”. Esta enfermedad provoca mortalidad de la cría (estadios larvales) durante una época específica del año, causa la pérdida de colmenas, con lo cual afecta de manera considerable el desarrollo de la apicultura en estas zonas.

A la fecha, no se tiene un estudio que cuantifique los daños ocasionados por el “mal de mayo” en los lugares de incidencia de la enfermedad. Sin embargo, de acuerdo con una investigación en la que se monitoreo un apiario experimental, constituido por ocho colmenas en la zona de Pérez Zeledón, seis colmenas que mostraron el cuadro clínico de la enfermedad murieron (75.0 %) y dos quedaron con una población muy baja de abejas (Jean, 1998). En el presente estudio, de 10 colmenas utilizadas para realizar la colecta de datos, ocho se perdieron (80.0 %), es decir, no quedaron abejas en la colmena, mientras que una quedó reducida a núcleo, con poca cantidad de abejas (requiriendo reforzarla con panales con cría, para propiciar su recuperación), por tanto, se determinó una pérdida considerable de colmenas de abejas africanizadas con signos asociados al “mal de mayo”. Estas colmenas se analizaron para determinar la presencia de otras enfermedades y confirmaron la presencia del ácaro *V. destructor* y del microsporidio *Nosema* spp. en niveles de leve a moderado. Mientras que se descartó la presencia de acariosis y del pequeño escarabajo de la colmena. Aun cuando el ácaro varroa ha sido reportado como uno de los parásitos que más pérdidas económicas causa en la producción apícola a nivel mundial (De Jong, 1997), los niveles de infestación observados en el presente estudio (leve a moderado) son tolerables en abejas africanizadas (Calderón et al., 1998; Calderón & Ramírez, 2013).

Por tanto, se debe indicar que la enfermedad “mal de mayo”, provoca pérdidas económicas considerables, ya que ocasiona la muerte de colmenas de abejas africanizadas, reduce colmenas a núcleos y, por ende, disminuye severamente la producción de miel (20-35 kg/colmena) y de otros productos, como jalea real, polen, propóleo, entre otros.

Se han realizado investigaciones con el objetivo de relacionar o descartar la presencia de algún agente infeccioso (principalmente virus) causante del problema. Se trató de reproducir la enfermedad mediante inoculación (aspersión y alimentación) de larvas sanas con macerados de larvas enfermas, y se obtuvieron resultados negativos. A su vez, con el microscopio electrónico de transmisión, se revisaron muestras de larvas enfermas, provenientes de zonas afectadas, para determinar la presencia de partículas virales; sin embargo, los análisis también resultaron negativos, confirmando la ausencia de virus (Calderón, R. A., comunicación personal, 30 de abril de 1997).

Con base en estudios realizados en el CINAT, se indica una fuerte relación entre la ingestión de polen de algunos árboles o plantas con la presentación del “mal de mayo”. Por lo anterior, se ha señalado la importancia de identificar las plantas utilizadas por las abejas para la colecta de polen y, por tanto, los tipos polínicos utilizados en la alimentación de larvas, en zonas donde la enfermedad se manifiesta cíclicamente. La presencia



de cría en las colmenas estimula la colecta de polen, con el cual las abejas preparan una masa que sirve de alimento larval durante cierto periodo de su desarrollo. Este alimento larval también está compuesto de néctar, agua y saliva (Espina, 1984; Ortega, 1986; Roubik, 1989). El tipo de polen colectado por la abeja *A. mellifera* depende de la disponibilidad en el campo. Se ha determinado que la abeja pecoreadora transporta a la colmena en cada vuelo, un promedio de 15 a 20 miligramos de polen (Espina, 1984). Una colonia de tamaño moderado (cerca de 40000 abejas en época seca) puede colectar y usar cerca de 100 libras de polen anualmente (Dade, 1994).

En un estudio, cuyo objetivo fue determinar la relación del polen como posible agente causal del “mal de mayo” en larvas de abejas melíferas, se colectó polen de un apiario en el cantón de Pérez Zeledón. El polen colectado se utilizó en la alimentación de núcleos de abejas en el CINAT, Lagunilla de Heredia. De los seis núcleos alimentados con polen, dos de ellos presentaron la signología descrita para el “mal de mayo”. Por lo que siendo el polen la variable introducida y no habiéndose reportado la presencia de esta enfermedad en la zona de Heredia, se indicó que el polen estaba involucrado como agente causal. Además, mediante el análisis palinológico se identificaron las plantas visitadas por las abejas (Jean, 1998). En otro ensayo, se estudió el espectro polínico presente en el sistema digestivo de larvas de *A. mellifera* afectadas por el “mal de mayo” (Calderón, R. A. & Cortés, I., comunicación personal, 30 de enero de 1998). Los tipos de polen identificados en las larvas se compararon con el polen colectado en colmenas afectadas, proveniente de Pérez Zeledón, Horquetas de Sarapiquí y de núcleos instalados en Lagunilla de Heredia (CINAT), obteniéndose las especies *Inga* sp., *Desmodium* sp., *Croton draco*, *Bursera simarouba*, *Syzygium malacense*, *Vochysia guatemalensis* y *Vochysia ferruginea*, como el resultado de un traslape en las áreas estudiadas. Considerando la época de floración, la distribución y mediante revisión de bibliografía, se descartaron cuatro de estas especies. Por lo cual, pueden considerarse como sospechosos de ser la causa del “mal de mayo”, el *V. guatemalensis* y el *V. ferruginea*.

En el presente estudio realizado en Pérez Zeledón, la floración del género *Vochysia* spp. coincidió con el inicio, desarrollo y finalización de la enfermedad. De manera, que se puede establecer una relación entre la presentación de la enfermedad “mal de mayo” con la floración del árbol. En relación con la composición química del género *Vochysia*, se indica que las especies *V. guatemalensis* y *V. ferruginea* acumulan altos niveles de aluminio en los tejidos foliares (Alvarado-Hernández et al., 2022). En un estudio realizado en pupas de abejorros (*Bombus* spp.), se determinó un elevado contenido de aluminio (altamente contaminadas), lo que indica una alta exposición. Asimismo, se demostró que este metal es un predictor negativo del peso medio de las pupas en la colonia (Exley et al., 2015), por lo que debe considerarse el análisis de aluminio y de otros componentes en el polen proveniente de colmenas enfermas.

En Brasil, relacionaron el polen de *Stryphnodendron* spp. Martius (Barbatimao), como agente causal de la enfermedad brasileña similar a la cría sacciforme (BSBD) (Pimentel & Message, 2004). Esta enfermedad posteriormente se asoció con la ingesta de polen con un elevado nivel de taninos, que provocaba daños en el desarrollo larval similares a los reportados en la zona de estudio. Por lo cual, se debe considerar un estudio que incorpore al análisis de este tipo de metabolitos en el polen.

Se debe mencionar que apicultores de la zona de Pérez Zeledón y alrededores manifestaron haber observado los signos del “mal de mayo” en sus apiarios y haber perdido colmenas en los meses de abril y mayo 2024, mientras que otros productores, indicaron no haber sido afectados de manera severa. Estas diferencias en el impacto de la enfermedad en apiarios de la misma región pueden deberse a diferentes factores como:



- Cantidad de cría: la presencia masiva de cría en las colmenas influye en la cantidad de polen proporcionado a cada larva individualmente, de manera que la cantidad recibida sea suficiente (o insuficiente) para desarrollar los signos de la enfermedad.
- Cantidad de polen en los panales: si la cantidad de polen almacenado en los panales es suficiente (reservas abundantes), probablemente el polen colectado se almacena (no se consume de manera inmediata), lo que disminuye el efecto de la enfermedad.
- Diferentes árboles o plantas en floración: la presencia de diferentes árboles en floración simultánea promueve la colecta de distintos tipos de polen utilizados en la alimentación de las larvas, favoreciendo una dieta más balanceada y completa, lo cual reduce (diluye) el efecto.

La composición nutricional del polen varía entre las diferentes especies vegetales y dentro de la misma especie, dependiendo de las condiciones del ambiente, la edad y el vigor de la planta (Free, 1993; Girón, 1996). Como se indicó, se ha reportado polen de baja calidad nutricional, como el polen de diente de león, deficiente en arginina, (Velthuis, 1992). Otro ejemplo es el polen de maíz, el cual tiene baja cantidad de proteínas y un gran porcentaje de almidón (Espina, 1984; Roubik, 1989). Además, debe considerarse el análisis de diferentes componentes en el polen proveniente de colmenas enfermas, como el aluminio, ya que es neurotóxico (Exley et al., 2015). Asimismo, no se debe descartar la presencia de otros compuestos en el polen colectado, como los taninos.

Perspectivas: debido a que los diferentes estudios relacionan la ingesta de polen de algunos árboles o plantas que florecen entre abril y mayo, como posible agente causal del “mal de mayo”, en una próxima investigación, se pretende suplementar un grupo de colmenas propensas a padecer la enfermedad en Pérez Zeledón, con polen colectado de lugares donde la enfermedad no está reportada y comparar el efecto con colmenas a las que no se les suministrará polen de estas zonas. Lo anterior, para analizar el posible efecto de dicha suplementación con polen de otras zonas apícolas, de manera que se pueda recomendar a los apicultores y con ello mitigar el impacto negativo del “mal de mayo” en la apicultura de cantones como Pérez Zeledón, donde se presenta en forma cíclica.

Agradecimientos

Deseamos agradecer a los apicultores de Pérez Zeledón y zonas aledañas, por la información brindada sobre la enfermedad “mal de mayo”.

Referencias

- Allen, M. & Ball, B. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, 77(3), 141-162. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1996.11099306>
- Alvarado-Hernández, A., Chávez-Corea, R., Chacón-Madrigal, E., Rodríguez-Alfaro, W., & Blanco-Montero, F. (2022). Diagnóstico foliar de nutrimentos de nueve especies forestales tropicales de tres pisos altitudinales en Centro América. *Agromonía Costarricense*, 46(1), 25-45. <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v46i1.49866>
- Amâncio, D. C. (2014). *Compostos bioativos do pólen*. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra [Tese de Doutorado].



- Anderson, D. L. & Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 165-189. <https://doi.org/10.1023/A:1006456720416>
- Arce, H. G., Sánchez, L. A., Slaa, J., Sánchez-Vindas, P. E., Ortiz, A., Van Veen, J. W., & Sommeijer, M. J. (2001). *Árboles Melíferos Nativos de Mesoamérica*. PRAM-CINAT/UNA-UU.
- Bailey, L. & Ball, B. (1991). *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London.
- Ball, B. (1996). Honey bee viruses: a cause for concern. *Bee World*, 77(3), 117-119.
- Botías, C., Martín, R., Meana, A., & Higes, M. (2012). Critical aspects of the *Nosema* spp. diagnostic sampling in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Parasitology Research*, 110, 2557-2561. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2760-2>
- Calderón, R. A., Arce, H., & Van Veen, J. (1998). Detección, distribución y control de *Varroa jacobsoni* Oudemans en Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 21, 31-40.
- Calderón, R. A., Sánchez, L. A., Yañez, O., & Fallas, N. (2008). Presence of *Nosema ceranae* in Africanized honeybee colonies in Costa Rica. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47, 328-329. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2008.11101485>
- Calderón, R. A. & Ramírez, F. (2013). *Enfermedades de las abejas melíferas, con énfasis en abejas africanizadas*. EUNA, Heredia, Costa Rica.
- Camacho, M. E., Alvarado, A. & Fernández, J. (2016). *Vochysia guatemalensis* Donn. Smith, an alternative species for reforestation on acid tropical soils. *New Forests*, 47,1-16. <https://doi.org/10.1007/s11056-016-9527-7>
- Central American Apibotanical Information System (CARABIS). (1994). *Base de datos sistematizada*. Programa Regional de Apicultura y Meliponicultura, Heredia, Costa Rica.
- Chinchilla, E. V. (1987). *Atlas cantonal de Costa Rica*. IFAM, San José, Costa Rica.
- Cooperación en los Sectores Forestales y Madereros (COSEFORMA). (1998). Recopilación de información silvicultural sobre 21 especies maderables nativas de la Región Huetar Norte de Costa Rica.
- Crane, E. (1990). *Bees and Beekeeping: Science, practice and world Resources*. Heinemann Newnes, Oxford.
- Dadant, C. (1992). *The Hive and the Honey Bee*. Bookcrafters Chelsea, Michigan.
- Dade, H. (1994). *Anatomy and Dissection of the Honey Bee*. IBRA, London.
- De Jong, D. (1997). *Mites: Varroa and other parasites of brood*. In: Morse, R.A. & Flottum, K., (Eds.). Honey bee pests, predators, and diseases. A.I. Root Company, Ohio.
- Espina, D. (1984). *Apicultura tropical*. Tecnológico de Costa Rica, Cartago.
- Exley, C., Rotheray, E., & Goulson, D. (2015). Bumblebee pupae contain high levels of aluminium. *PLOS ONE*, 10(6), e0127665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127665>
- Free, J. (1993). *Insect Pollination of Crops*. Academic Press, London.
- Girón, M. (1996). *Melitopalínología. Recolección de polen y néctar por Apis mellifera en algunas especies de plantas silvestres y cultivadas del Municipio de Salgar (Antioquía)*. Litografía-Luz, Bogotá.



- Harbone, J. (1985). *Introducción a la bioquímica ecológica*. Editorial Allhambra, España.
- Holdridge, L. (1978). *Ecología basada en zonas de vida*. San José, Costa Rica.
- Holdridge, L., Poveda, L., & Jiménez, Q. (1997). *Árboles de Costa Rica*. Centro Científico Tropical. San José, Costa Rica.
- Jean, W. (1998). Determinación del polen como posible agente causal de la enfermedad denominada “mal de mayo” en larvas de abejas (*Apis mellifera*). [Tesis para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica]. Universidad Nacional, Heredia.
- Martínez, E. (1993). *Atlas de las plantas y el polen utilizados por las cinco especies principales de las abejas productoras de miel en la región de Tacanas, Chiapas*. UNAM, México.
- Message D., Ball B.V., & Silva I.C. (1995). A Serious brood disease affecting Africanized honeybees (*Apis mellifera*). XXXIV International Apicultural Congress (APIMONDIA), Lausanne, Suiza.
- Morton, J. F. (1987). *Fruits of warm climates*. C. F. Dowling, Miami.
- Ortega, J. L. (1986). *Flora de interés apícola y polinización de cultivos*. Editorial Mundi Prensa, Madrid.
- Pimentel, A. C. & Message, D. (2004). A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoideae) which causes sacbrood-like symptoms. *Apidologie*, 35, 89-90. DOI: 10.1051/apido:2003059
- Ritter, W. (2001). *Enfermedades de las abejas*. Acribia, Zaragoza.
- Roubik, D. W. (1989). *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press, New York.
- Roubik, D. W. (1995). *Pollination of Cultivated Plants in the Tropics*. FAO. Agriculture Service. Bulletin 48.
- Santos, M. L. A. (2007). *Análise dos constituintes químicos do pólen e da inflorescência de Stryphnodendron polyphyllum, em relação à cria-ensacada brasileira em Apis mellifera*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Dissertação de Mestrado em Ciências.
- Spivak, M. (1991). *The Africanization process in Costa Rica*. Westview Press Inc.
- Traver, B. & Fell, R. (2011). Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.02.003>
- Valles, S. M., Chen, Y., Firth, A. E., Guerin, D. M. A., Hashimoto, Y., Herrero, S., de Miranda, J. R., Ryabov, E., and ICTV Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iflaviridae*. *Journal of General Virology* 98:527–528 <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000757>
- Van Veen, J., Calderón, R. A., Cubero, A., & Arce, H. (1998). *Varroa jacobsoni* Oudemans in Costa Rica: Detection, Spread and Treatment with Formic Acid. *Bee world*, 79(1), 5-10. <https://doi.org/10.1080/0005772X>
- Van Veen, J. W., Arce, H., Calderón, R. A. & Ramirez, F. (2001). A new brood disease affecting honeybees in Costa Rica. XXXVII International Apicultural Congress (APIMONDIA), Durban, South Africa.
- Velthuis, H. H. W. (1992). Pollen Digestion and the Evolution of Sociality in Bees. *Bee World*, 73(2), 77-78. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1992.11099119>